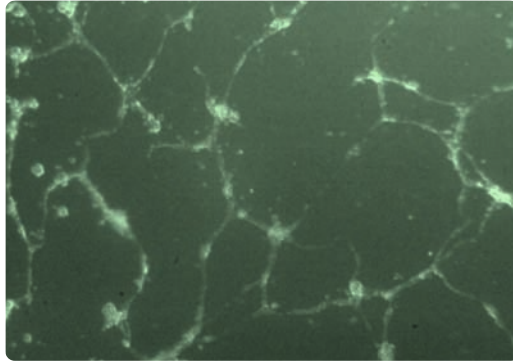


Die Regulation von Namp1 nach Myokardinfarkt

Kristina Jores



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition wissenschaft
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie,
Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. R. Gerstberger
und

aus der Medizinischen Klinik I
Abteilung für Kardiologie / Angiologie der
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen,

Gf. Direktor: Prof. Dr. C. Hamm

Betreuer: Prof. Dr. D. Sedding

Die Regulation von Namp1 nach Myokardinfarkt

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades der
Doktorin der Veterinärmedizin (Dr. med. vet.)
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Kristina Jores

Tierärztin aus Neuwied/Rhein

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. R. Gerstberger
Prof. Dr. D. Sedding

Tag der Disputation: 27.06.2014

Meinen Eltern

1 Inhaltsverzeichnis

1	<u>Inhaltsverzeichnis.....</u>	<u>1-2</u>
2	<u>Einleitung.....</u>	<u>7</u>
2.1	DER MYOKARDINFARKT.....	7
2.1.1	Epidemiologie.....	7
2.1.2	Symptomatik.....	7
2.1.3	Pathogenese.....	7
2.1.4	Hypoxie im Herzen.....	10
2.1.5	Aufbau des Infarktareals.....	10
2.2	ANGIOGENESE.....	12
2.2.1	Therapeutische Angiogenese.....	12
2.2.2	Definition.....	12
2.2.3	Angiogenese im Rahmen pathologischer Prozesse.....	14
2.3	NICOTINAMID PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE NAMPT.....	15
2.4	MICRORNAs.....	16
2.4.1	Grundlagen.....	16
2.4.2	Synthese und Funktion von miRNAs.....	16
2.5	SIRTUINE.....	20
2.5.1	Entdeckung, Eigenschaften, Einteilung.....	20
3	<u>Fragestellung.....</u>	<u>24</u>
4	<u>Material und Methoden.....</u>	<u>27</u>
4.1	MATERIAL.....	27
4.1.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	27
4.1.2	Versuchstiere.....	29
4.1.3	Chemikalien und Pharmaka.....	29
4.2	METHODEN.....	32
4.2.1	Tierexperimentelle Arbeiten.....	32
4.2.2	Experimenteller Myokardinfarkt.....	33
4.2.3	Das Elektrokardiogramm nach Myokardinfarkt.....	37
4.2.5	Western Blot.....	42
4.2.6	Proteinisolierung.....	42

4.2.7	Proteinkonzentrationsbestimmung	42
4.2.8	Primärantikörper	43
4.2.9	Sekundärantikörper	43
4.2.10	Proteinaufbereitung	43
4.2.11	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	44
4.2.12	Transfer	44
4.2.13	Immundetektion der aufgetrennten Proteine	45
4.2.14	Isolierung von murinen Kardiomyozyten nach Myokard-infarkt	46
4.2.15	Isolierung von Leukozyten aus venösem Blut	46
4.2.16	Arbeiten mit Endothelzellen aus humanen Koronararterien (HCAECs)	47
4.2.17	Kombinierte RNA- und miRNA-Isolierung	48
4.2.18	<i>Real-time</i> quantitative Polymerase-Kettenreaktion	50
4.2.19	Reverse Transkription: RNA	51
	Reverse Transkription: miRNA	52
	Quantitative <i>real-time</i> PCR	52
	<i>Real-time</i> PCR: miRNA	54
4.2.20	SIRT1 <i>activity</i> Assay	55
4.2.21	Reverse Transfektion mit miRNA-Inhibitoren (anti-mi-RNAs) bzw. miRNA-Precursor-Molekülen (pre-miRNAs)	56
4.2.22	Endothelzell-Stimulation mit verschiedenen Faktoren	57
	Hypoxiebehandlung	58
4.2.23	Proliferationsassay	59
4.2.24	Migrationsassay	60
4.2.25	<i>Tube formation</i> Assay	61
4.2.26	Transfektion von Endothelzellen mit Nampt siRNA	62
4.2.27	<i>In silico</i> Methode zur miRNA Zielenvorhersage	63
4.2.28	Luciferase Assay	64
	Reverse Transfektion von HEK-Zellen	65
	Luciferase-Assay	66
4.2.29	<i>In-situ</i> Hybridisierung (ISH)	67
5	<u>Ergebnisse</u>	74
5.1	NAMPT EXPRESSION	74
5.1.1	Nampt Expression nach Myokardinfarkt <i>in vivo</i>	74
5.2	EXPRESSION VON MIRNA-374 NACH MYOKARDINFARKT <i>IN VIVO</i> SOWIE IN ISOLIERTEN ZELLFRAKTIONEN	77

5.3 EINFLUSS VERSCHIEDENER STIMULI AUF DIE EXPRESSION VON NAMPT UND MIRNA-374 IN HCAECs	78
5.3.2 Expression von Nampt nach Faktoren-Behandlung	80
5.4 IN SITU NACHWEIS DER VERMEHRTEN EXPRESSION VON MIRNA-374 IN KARDIALEN ENDOTHELZELLEN NACH MYOKARDINFARKT	84
5.5 ÜBEREXPRESSION VON MIRNA-374 IN HCAECs IN VITRO.....	84
5.5.1 Expression von Nampt nach miRNA-374 Überexpression	85
5.5.2 Angiogenese nach miRNA-374 Überexpression	87
5.5.3 Funktionelle Assays nach miRNA-374 Überexpression	87
5.5.3.2 Migration nach miRNA-374 Überexpression	89
5.6.1 Expression von Nampt nach miRNA-374 <i>knock-down</i>	92
5.6.3 Funktionelle Assays nach miRNA-374 <i>knock-down</i>	95
5.8. <i>Knock-down</i> von miRNA-374 in HCAECs unter Hypoxie.....	97
 6 Diskussion	 108
 6.1 DAS MAUSMODELL ZUM MYOKARDINFARKT	 108
6.1.1 Herzinfarkt-Modelle in der Forschung	108
6.1.2 Limitationen des Tiermodells	109
6.1.2.1 Atherosklerose beim Tier	109
6.1.2.2 Unterschiede in der koronaren Gefäßversorgung.....	110
6.1.2.3 Der Größenunterschied der Spezies	110
6.2 DIE REGULATION VON NAMPT NACH MYOKARDINFARKT	111
6.2.1 Nampt ist nach Myokardinfarkt signifikant herunterreguliert	111
6.2.1.1 CDK4 als Ladungskontrolle.....	112
6.2.2 Nampt ist vor allem in der endothelzellreichen Fraktion herunterreguliert	113
6.2.2.1 Charakterisierung der endothelzellreichen Zellfraktion	114
6.2.2.2 Isolation von Leukozyten aus dem peripheren Blut von Mäusen	114
6.2.2.3 Unterschiede in der Höhe der Regulation von Nampt	115
6.3 DIE REGULATION VON MIRNA-374 NACH MYOKARDINFARKT	115
6.3.1 Signifikante Hochregulation von miRNA-374 nach Myokardinfarkt.....	116
6.4 HYPOXIE ALS URSACHE DER EXPRESSIONSÄNDERUNGEN VON NAMPT UND MIRNA-374	117
6.4.1 Nampt Herunterregulation durch Hypoxie	117
6.4.2 Vermehrte Expression von miRNA-374 unter Hypoxie	118
6.5 IN SITU HYBRIDISIERUNG OHNE SIGNIFIKANTE ERGEBNISSE	118
6.6 ÜBEREXPRESSION VON MIRNA-374	119

6.6.1	Regulation von Nampt nach miRNA-374 Überexpression	119
6.6.2	Reduzierte Angiogeneseaktivität nach miRNA-374 Über-expression	119
6.6.3	Kein Einfluss von miRNA-374 Überexpression auf Proliferation und Migration 120	
6.7	<i>KNOCK-DOWN VON MIRNA-374</i>	120
6.7.1	Regulation der Nampt nach miRNA-374 <i>knock-down</i>	120
6.7.2	Fehlender Einfluss von miRNA-374 <i>knock-down</i> auf Proliferation, Migration und <i>tube formation</i>	121
6.8	<i>KNOCK-DOWN VON MIRNA-374 UNTER 72 H HYPOXIE</i>.....	121
6.8.1	Erhöhte anti-miRNA-374 Konzentration unter Hypoxiebedingungen	121
6.8.2	Verminderte <i>tube formation</i> nach miRNA-374 <i>knock-down</i> unter Hypoxie	121
6.9	<i>NAMPT KNOCK-DOWN</i>.....	122
6.9.1	Keine Bindung von Nampt und miRNA-374 im Luciferase Assay nachweisbar 122	
6.10	<i>SIRT1 – EIN POTENTIELLES DOWN-STREAM TARGET VON NAMPT</i>	123
6.10.1	SIRT1 signifikant herunterreguliert, SIRT1-Aktivität zeit-abhängig reduziert nach Myokardinfarkt	123
6.11	<i>AUSBLICK</i>	126
<u>7</u>	<u><i>Zusammenfassung</i></u>	<u>127</u>
7.1	<i>ZUSAMMENFASSUNG</i>	127
7.2	<i>SUMMARY</i>	129
<u>8</u>	<u><i>Abbildungsverzeichnis</i>.....</u>	<u>131</u>
<u>9</u>	<u><i>Tabellenverzeichnis</i>.....</u>	<u>132</u>
<u>10</u>	<u><i>Literaturverzeichnis</i>.....</u>	<u>133</u>
<u>11</u>	<u><i>Anhang</i></u>	<u>140</u>
11.1	<i>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</i>	140
<u>12</u>	<u><i>Publikationen</i></u>	<u>145</u>
12.1.1	Vorträge und Posterpräsentationen.....	145
12.1.2	Vorträge.....	145

12.1.3	Posterpräsentationen	146
<u>13</u>	<u>Lebenslauf</u>	<u>147</u>
<u>14</u>	<u>Danksagung</u>	<u>149</u>
<u>15</u>	<u>Erklärung</u>	<u>151</u>

2 Einleitung

2.1 Der Myokardinfarkt

2.1.1 Epidemiologie

Herz-Kreislauferkrankungen stellen nach den Ergebnissen der „*monitoring trends and determinants in cardiovascular disease*“ (MONICA) Studie der Weltgesundheitsorganisation (WHO) nach wie vor die Haupttodesursache in der westlichen Welt dar¹. Auch in der Bundesrepublik Deutschland ist die Prävalenz mit geschätzten 1,5 Millionen Patienten sehr hoch. Jährlich erleiden rund 280.000 Menschen einen Herzinfarkt². Trotz fortschreitender wissenschaftlicher Erkenntnisse und Weiterentwicklung von therapeutischen Ansätzen liegt die Mortalität nach Myokardinfarkt immer noch bei 30 - 50 %, wobei die Hälfte dieser Patienten bereits während der ersten beiden Stunden nach Infarkt verstirbt³. Die präventiven Strategien konzentrieren sich derzeit auf eine Reduktion der wichtigsten Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Bluthochdruck, *Diabetes mellitus*, Rauchen, Übergewicht und Stress⁴.

2.1.2 Symptomatik

Leitsymptome des akuten Myokardinfarkts sind die typische retrosternale Schmerzlokalisierung und -charakteristik (Druck, Engegefühl) sowie charakteristische Veränderungen im Elektrokardiogramm (EKG) in Form einer ST-Streckenhebung (und/oder eines Linksschenkelblocks). Weiterhin kann ein Anstieg der Biomarker Troponin I (*troponin-inhibiting* Protein) oder Troponin T (Tropomyosin-bindendes Troponin) im Blut als Indiz für ein Vorhandensein nekrotischer Zellverbände gewertet werden⁵.

2.1.3 Pathogenese

Der Myokardinfarkt wird definiert als der Tod von Herzmuskelzellen infolge einer langandauernden Ischämie³. Die häufigste Ursache für einen Myokardinfarkt stellt ein Thrombus in den Herzkranzgefäßen nach Ruptur einer atherosklerotischen Plaque dar⁶. Ursächlich für die Entstehung atherosklerotischer Plaques ist das Einwirken von Risikofaktoren wie

Hypercholesterinämie, Bluthochdruck, *Diabetes mellitus* und Rauchen auf das Gefäßendothel. Nachfolgend kommt es zu endothelialer Dysfunktion, Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung, chronischer Entzündung mit Einwanderung von Leukozyten sowie Aktivierung und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Von den geschädigten Endothelzellen, Entzündungszellen, Thrombozyten und glatten Gefäßmuskelzellen werden im Folgenden Zytokine und Wachstumsfaktoren freigesetzt. Dies wiederum führt zu fortschreitender Einwanderung von Entzündungszellen und glatten Gefäßmuskelzellen aus der *Tunica media* in die *Tunica intima*. In den nachfolgenden Remodelingvorgängen entsteht schließlich durch Reorganisation mit einwandernden Bindegewebszellen eine atherosklerotische Plaque mit einer aus glatten Gefäßmuskelzellen und Bindegewebe bestehenden Kappe⁷ (Abb.1). Kommt es nun durch eine Schwachstelle in dieser Kappe zu einer Plaqueruptur, so folgt durch Thrombozytenaktivierung die Entstehung eines Thrombus. Durch das Ablösen eines solchen Thrombus kann es zu einem thrombotisch-embolischen Geschehen mit Verlegung eines distalen Gefäßes kommen. Ist hiervon ein Herzkranzgefäß betroffen, so wird die Blutversorgung des von diesem Gefäß perfundierten Gewebes behindert oder sogar vollständig unterbrochen. Dies führt nachfolgend zu einer Blutleere (Ischämie). Durch die daraus resultierende fehlende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung unterliegen die Zellen dieses Areals dem nekrotischen Zelltod⁸.

Das Ausmaß der myokardialen Ischämie wird durch die Größe des infarzierten Areals, den Grad des Gefäßverschlusses, die Dauer bis zu einer eventuellen Reperfusion, den Grad der Kollateralversorgung, den Sauerstoffbedarf des Myokards zum Zeitpunkt des Infarkts und die Intensität der Reperfusion bestimmt⁹. Die Größe der resultierenden myokardialen Nekrose ist ein entscheidender Faktor für die Langzeitprognose¹⁰.

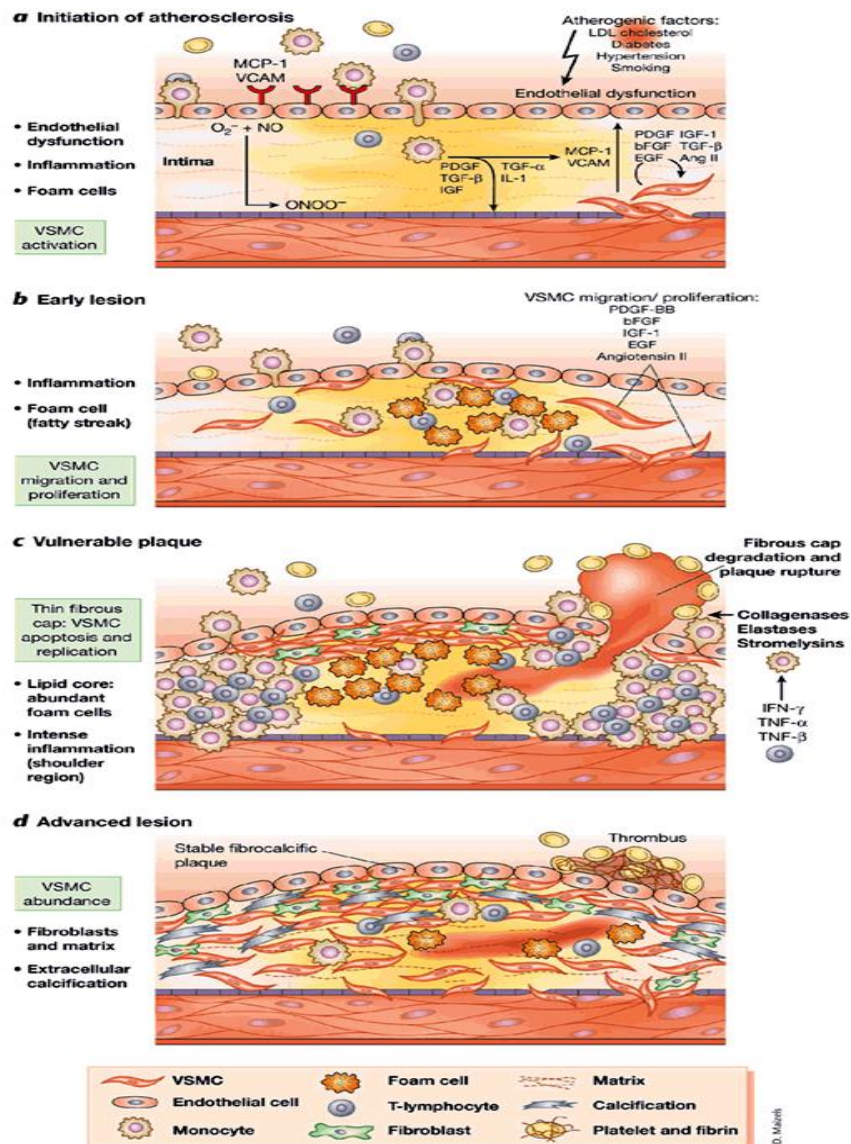


Abbildung 1: Vorgänge bei der Atherosklerose (aus Dzau et al.; Nat Med.; 2002)

Durch das Einwirken kardiovaskulärer Risikofaktoren auf das Gefäßendothel (EC) wird eine Kaskade zellulärer Vorgänge initiiert, an deren Ende die Bildung einer atherosklerotischen Läsion steht.

- Zunächst kommt es zur Rekrutierung von Leukozyten sowie der Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren.
- Dies wiederum stellt einen großen Wachstumsreiz für vaskuläre glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) dar, welche nachfolgend migrieren, proliferieren und extrazelluläre Matrix synthetisieren. Es kommt zur Bildung einer fibrösen Kappe der atherosklerotischen Läsion.
- Weitere Entzündungsmediatoren exprimieren nun verschiedene Proteasen, die zu einer Ausdünnung der fibrösen Kappe beitragen. Es besteht dann die Gefahr einer Plaqueruptur und nachfolgender Thrombusbildung
- In fortgeschrittenen Fällen bilden sich auch sogenannte „fibrokalzifizierte Läsionen“. Diese sind gekennzeichnet durch einen erhöhten Gehalt an Fibroblasten, VSMCs und extrazelluläre Kalzifikation

LDL, low-density-lipoprotein; MCP, monocyte chemoattractant protein; VCAM, vascular cell adhesion molecule; PDGF-BB, platelet-derived growth factor (BB, β -chain homodimer); TNF, tumor necrosis factor; TGF, transforming growth factor; IL-1, interleukin-1; IGF, insulin-like growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; Ang II, angiotensin II; EGF, epidermal growth factor; IFN, interferon ¹¹.

2.1.4 Hypoxie im Herzen

Der Sauerstoffgehalt der Einatemluft entspricht der atmosphärischen Sauerstoffkonzentration von 21 %. Die Zellen des Körpers erreicht ein Sauerstoffgehalt von 0,5 - 12 % bzw. ein Sauerstoffpartialdruck von < 3 - 90 mmHg, je nach Gewebe oder Organ. Die Sauerstoffkonzentration des arteriellen Blutes beträgt etwa 14 % bzw. 100 mmHg; im Myokard sind es weniger als 10 %. Normoxie der Zellen ist variabel. Sie wird bestimmt durch die Lage der Zellen innerhalb eines Organs sowie des Funktionszustandes des betreffenden Gewebes. Hypoxie kann generell definiert werden als eine vorherrschende Sauerstoffkonzentration, welche unterhalb der benötigten Konzentration der betreffenden Zellen, bzw. des jeweiligen Gewebes oder Organs liegt. Im Myokard wird eine Sauerstoffkonzentration von 1 - 3 % als Hypoxie beschrieben¹².

Das Herz ist ein obligat aerobes Organ. Mit einem Sauerstoffverbrauch von 5 - 8 ml/min/100g Gewebe unter Ruhebedingungen liegt es im Verbrauch deutlich oberhalb dessen des Gehirns mit 3 ml/min/100g. Unter Belastung kann der Verbrauch auf bis zu 70 ml/min/100g ansteigen. Sauerstoff im Herzen trägt nicht nur zur Aufrechterhaltung der Energiebilanz bei. Er beeinflusst unter Anderem die kardiale Genexpression, die Bereitstellung von Stickstoffmonoxid (NO) zur Blutdruckregulation und die Kontraktilität des Herzens. Auf Hypoxie reagiert der Herzmuskel daher äußerst empfindlich. Er ist unter diesen Bedingungen nicht mehr in der Lage, genügend Energie zu produzieren, um essentielle Stoffwechselvorgänge und Funktionen des Organs aufrecht zu erhalten¹³.

2.1.5 Aufbau des Infarktareals

Das Infarktareal ist heterogen aufgebaut. Es besteht zu einem Teil aus aufgrund der Hypoxie nekrotischen, absterbenden Zellen, unterbrochen von Inseln sogenannter "*hibernating cells*" („Zellen im Winterschlaf“). Diese Zellen befinden sich in einem Ruhemodus und haben die Möglichkeit, sich an die Situation des limitierten Sauerstoff- und Nährstoffangebotes anzupassen, indem sie ihren Energiebedarf, ihre kontraktile Ultrastruktur und ihr Genexpressionsprogramm verändern. Es kommt unter anderem zu einer vermehrten Glykogenspeicherung, einer verminderten Expression mitochondrialer, oxidativer Enzyme und Autophagozytose. Dies ist ein zellulärer Prozess, bei

dem es ähnlich wie bei der Phagozytose zum Abbau verschiedener Zellbestandteile kommt. Ein Mangel an Nährstoffen führt zum Abbau von nicht essentiellen Zellbestandteilen. Dadurch können überlebenswichtige Prozesse weiterhin mit Energie versorgt werden. Diese Zellen können nach wiederhergestellter Perfusion vollständig regenerieren und funktionell aktiv werden¹⁴.

2.1.6. Therapieansätze

Die Therapie des Myokardinfarkts besteht derzeit in einer möglichst zeitnahen Reperfusion des ischämischen Gewebes, um die Größe des Infarktareals und die funktionelle Beeinträchtigung so gering wie möglich zu halten¹⁵. Dies geschieht durch thrombolytische Therapie, perkutane transluminale Angioplastie sowie koronare Bypassoperationen¹⁶. In vielen Fällen sind allerdings die atherosklerotischen Läsionen bereits so weit fortgeschritten bzw. sind so viele Gefäße betroffen, dass die genannten Therapieoptionen für etwa 1/5 der Patienten nicht ausreichend sind¹⁷. Es ist daher von Bedeutung, weitere Behandlungsmethoden zu entwickeln, um die Situation und die Prognose von Patienten nach Myokardinfarkt zu verbessern.

2.1.7 Das Mausmodell

Tiermodelle eignen sich in der naturwissenschaftlichen Forschung aufgrund der hohen Vergleichbarkeit der Gene von Mensch und Laborsäugetieren gut zur Untersuchung von physiologischen und pathologischen Vorgängen. Das Mausgenom ist mittlerweile sehr gut erforscht, so dass Experimente mit sogenannten „knockout“ Mäusen oder mit Mäusen, bei denen bestimmte Zielgene überexprimiert wurden, zur systematischen Erforschung von spezifischen Genfunktionen möglich geworden sind. Es hat sich zudem gezeigt, dass das Mausgenom und das menschliche Genom bezüglich der Entwicklung des Herz-Kreislauf Systems ähnlich reguliert werden. Des Weiteren weisen Mäuse aufgrund ihrer geringen Größe, der kurzen Reproduktionszeiten und der verhältnismäßig geringen Haltungskosten weitere Vorteile gegenüber größeren Modellorganismen auf¹⁸. Das Myokardinfarkt-Modell mit Ligatur des absteigenden Astes der linken Koronararterie (*Ramus interventricularis anterior* – RIVA; englisch: *left anterior descending coronary artery* – LAD) am Mäuseherz ist bereits

gut etabliert und führt bei gleicher Höhe der Ligatur zu reproduzierbaren Infarktgrößen¹⁹.

2.2 Angiogenese

2.2.1 Therapeutische Angiogenese

Ein Ansatz zu einer möglichst schnellen Wiederherstellung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des infarzierten Gewebes bzw. des Periinfarkt-Gewebes am Herz ist die Unterstützung der Neubildung von Gefäßen im betroffenen Gebiet. Ziel ist es, eine verbesserte Versorgung der minderperfundierten Areale und hierdurch eine Verkleinerung der zurückbleibenden Infarktnarbe und damit eine verbesserte Herzfunktion zu erreichen. Trotz intensiver Forschung zur Stimulation der Revaskularisierung ischämischer Gebiete sind die therapeutischen Möglichkeiten bisher leider immer noch begrenzt. Gegenstand aktueller Forschung stellt die Implantation knochenmarkstämmiger Vorläuferzellen in das Zielgebiet oder die Stimulation von Angiogenese mit Hilfe proangiogen wirkender Substanzen dar. Erste klinische Studien am Menschen zeigten bisher aber nur geringe Effekte, so dass die Entwicklung effektiver therapeutischer Ansätze zur Verbesserung der Angiogenese weiterhin im Fokus der derzeitigen Forschung steht^{20,21}.

2.2.2 Definition

Man unterscheidet Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese.

Als **Vaskulogenese** wird die Entstehung von primären Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen vorwiegend während der embryonalen Entwicklung bezeichnet. Hierbei differenzieren sich zunächst Hämangioblasten, die gemeinsamen Vorläuferzellen von endothelialen und hämatopoetischen Zelllinien, zu Angioblasten. Diese migrieren und formen einen primitiven Gefäßplexus. Aus Angioblasten entstehen dann im Folgenden Endothelzellen. Ausgelöst wird die Vaskulogenese durch körpereigene Botenstoffe, wie dem *vascular endothelial growth factor* (VEGF)^{22,23}.

Dagegen stellt **Angiogenese** die Neubildung von Blutgefäßen durch Sprossung von Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen dar. Beim adulten Organis-

mus findet hauptsächlich diese Form der Gefäßneubildung statt. Im Mittelpunkt der Angiogenese stehen Endothelzellen, welche Phasen der Migration, Proliferation und Differenzierung durchlaufen. Wichtigster Botenstoff hierbei ist ebenfalls VEGF mit seinen zwei Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2. Des Weiteren sind periendotheliale Komponenten beteiligt wie die Basalmembran und Perizyten. Letztere werden vornehmlich durch *platelet-derived growth factor* (PDGF-BB) sowie Angiopoetin-1 rekrutiert (Abb. 2)²⁴.

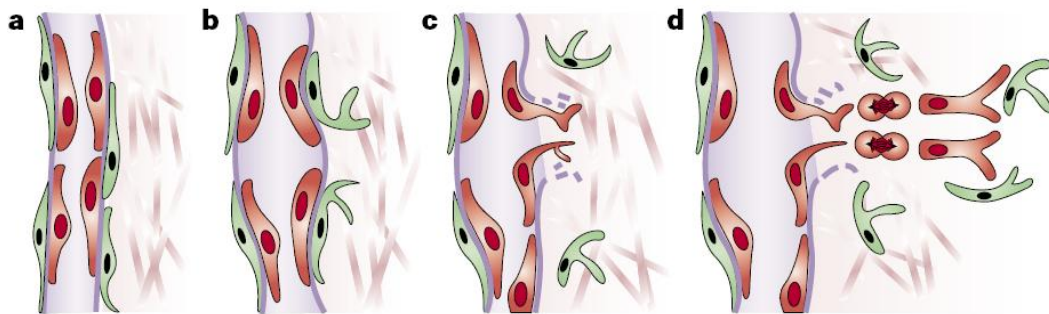


Abbildung 2: Vorgänge bei der Angiogenese (aus: Bergers et al.; Nat Rev Cancer; 2003)

Durch einen angiogenen Reiz wie z.B. Hypoxie kommt es zur Initiation der Angiogenese.

(a): Der erste Schritt der Angiogenese besteht in der Aktivierung von Endothelzellen durch verschiedene Botenstoffe, allen voran dem vascular endothelial growth factor (VEGF).

(b): Es kommt nachfolgend zur Ablösung von Perizyten und Dilatation des Ursprungsgefäßes durch Stickstoffmonoxid. Es folgt die Degradierung der Basalmembran und der extrazellulären Matrix durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs).

(c): Durch Plasminaktivierung kommt es nun zu einer Mobilisierung des fibroblastic growth factor (FGF). Dieser wirkt stark angiogen und initiiert unter anderem die Migration der Endothelzellen.

(d): Endothelzellen proliferieren, maturieren und interagieren mit Bindegewebszellen sowie Komponenten der ECM, um neue Gefäßwandstrukturen aufzubauen. Hierfür bilden Endothelzellen den platelet-derived growth factor, der als Mitogen wirkt.

Endothelzellen (rot) und subendothelial gelegene Perizyten (grün); Basalmembran (violett); glatte Gefäßmuskelzellen (pink); Fibroblasten; ECM, extrazelluläre Matrix^{24 25}.

Als **Arteriogenese** bezeichnet man die Ausbildung von kleineren Arteriolen und Arterien aus bestehenden Kapillaren, die sämtliche drei Wandschichten (*Tunica intima*, *Tunica media*, *Tunica adventitia*) besitzen. Als zusätzliche Wandkomponente sind hier unterschiedlich dicke Schichten an glatten Gefäßmuskelzellen beteiligt. Eine wichtige Funktion bei der Stabilisierung von Gefäßen spielen der *platelet-derived growth-factor* (PDGF-BB) und sein Rezeptor PDGFR-β. Er sorgt für die Rekrutierung mesenchymaler Vorläuferzellen, die sich zu glatten Gefäßmuskelzellen entwickeln²³.

2.2.3 Angiogenese im Rahmen pathologischer Prozesse

Im erwachsenen Organismus findet Angiogenese physiologischerweise vor allem während zyklischer Veränderungen im Ovar sowie in der Plazenta während der Gravidität statt. Pathologisch kommt es im Rahmen vieler reparativer Prozesse wie der Wundheilung, aber auch in Form unkontrollierter Gefäßneubildung im Zusammenhang bestimmter Retinopathien, rheumatischer Erkrankungen und in der Tumorentwicklung zu Angiogeneseprozessen im adulten Organismus²². Auch im Zusammenhang mit ischämischen Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt oder der cerebralen Ischämie kommt es im Rahmen reparativer Prozesse zu Gefäßneubildung durch Angiogenese²⁶.

Ein wichtiger Stimulus für die Angiogenese stellt die Hypoxie dar. Hierbei kommt es hauptsächlich durch die Aktivierung des *hypoxia-inducible transcription factor* (HIF) zur Transaktivierung der Expression vieler angiogen wirkender Proteine, allen voran des VEGF²³. So konnte in einer Studie an Rattenherzen eine hypoxiebedingte Hochregulation von VEGF gezeigt werden. Nach Induktion eines Myokardinfarkts an perfundierten Rattenherzen für 10 - 15 min, aber auch nach Hypoxiebehandlung von Kardiomyozyten kam es hier bereits nach 30 min zu einer vermehrten Expression von VEGF, die für mindestens 30 min anhielt²⁷. In einer anderen Studie wurde ebenfalls eine 7-fach erhöhte Expression von VEGF nach Hypoxiebehandlung von Kardiomyozyten- und Fibroblastenzellkulturen aus Rattenherzen von Neugeborenen gemessen²⁸. Auch beim Mensch kommt es zu einer Stimulation der Angiogenese im Herz nach Myokardinfarkt. So stellte eine Studie in Gewebeproben des Myokards von Patienten, die einer Bypass-Operation nach Myokardinfarkt unterzogen wurden, eine vermehrte Expression von HIF-1 α und VEGF fest. Im Gegensatz dazu konnte in Proben von Herzen gesunder Menschen keine messbare Expression von HIF-1 α bzw. VEGF festgestellt werden²⁹. Auch im peripheren Blut von Herzinfarktpatienten oder Patienten mit wiederkehrender *Angina pectoris*, einer vorübergehenden Durchblutungsstörung am Herz, konnte eine vermehrte Expression von VEGF nachgewiesen werden³⁰.

Abzugrenzen von der Angiogenese, also der *de novo* Entstehung von Gefäßen am Herzen als Folge von Ischämie, ist die Arteriogenese. Bei der Arteriogenese kommt es zur Ausbildung von kollateralen Arterien aus bereits existierenden

Kapillaren vor allem in chronisch sauerstoffunterversorgten Gebieten. Die neuen Gefäße entstehen als „natürlicher Bypass“ zum Beispiel in unmittelbarer Nachbarschaft zu stark atherosklerotisch veränderten Gefäßen³¹.

2.3 Nicotinamid Phosphoribosyltransferase Nampt

Nampt repräsentiert ein Protein, welches an verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen, die im Körper im Rahmen des *“acute respiratory distress syndrome“*, des Alterns, einer Atherosklerose, bei Krebs, *Diabetes mellitus* und rheumathoider Arthritis sowie Sepsis zu finden sind, beteiligt ist. Es wird in fast allen Organen, Geweben und Zelltypen exprimiert. Die höchste Expression von Nampt-spezifischer mRNA findet man in der Leber und im Muskelgewebe³². Je nach Funktion ist Nampt unter verschiedenen Namen in der Literatur beschrieben worden. Unter dem Namen Nicotinamid Phosphoribosyl-transferase (Nampt) spielt es darüber hinaus eine wichtige enzymatische Rolle in der Biosynthese von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD⁺) bei Säugetieren³³. Es gibt im Säugetierorganismus drei beschriebene Wege zur Biosynthese von NAD⁺, zum einen die *de novo* Synthese von NAD⁺ aus Aminosäuren (z.B. Tryptophan und Asparaginsäure), durch die extrazelluläre Aufnahme von Nicotinamid (NA) oder Nicotinamid Ribosid (NR) und schließlich die Möglichkeit eines Recycling-Syntheseweges. Hierbei wird das Abbauprodukt Nicotinamid zu NAD⁺ recycelt. Maßgebend für diesen Recycling-Syntheseweg ist das Enzym Nampt³⁴. Es wurde weiterhin unter dem Namen *“pre-B-cell colony-enhancing factor“* (PBEF) bekannt, einem inflammatorischen Zytokin, das eine Rolle bei der Apoptose von neutrophilen Granulozyten im Verlauf einer Sepsis spielt³⁵. Es ist ebenfalls als Visfatin, einem eventuell insulinähnlich wirkenden Adipozytokin, beschrieben worden³⁶.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Nampt sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene nach verschiedenen Stress-Stimuli wie Ischämie, Ischämie/Reperfusion (I/R) und Bluthochdruck im Herz von Mäusen signifikant herunterreguliert war. Des Weiteren schützt Nampt vor Apoptose und fördert die Autophagozytose. Eine herzspezifische Überexpression von Nampt resultiert in erhöhten NAD⁺ Spiegeln in Kardiomyozyten und in einer kleineren Infarktausbildung nach Ischämie und I/R. Auch konnte eine verminderte Apoptose in den

Randbereichen des Infarktareals sowie eine vermehrte Autophagozytose nachgewiesen werden³⁷. Die intravenöse Gabe von Nampt in der frühen Reperfusionphase nach Myokardinfarkt resultierte in einer um 20 % kleineren Infarktfläche in einem Mausmodell zur I/R³⁸. Auch in einem *in vitro* I/R-Modell konnte eine signifikant verringerte Nekroserate von Kardiomyozyten nach Nampt-Applikation gezeigt werden³⁹. Es ist zudem bekannt, dass Nampt die Zellproliferation und -migration fördert und die Angiogenese *in vitro* in HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) sowie *in vivo* an einem Matrigel-Plug- und einem Hinterlauf-Ischämie-Modell der Maus verstärkt⁴⁰⁻⁴².

2.4 MicroRNAs

2.4.1 Grundlagen

MicroRNAs (miRNAs) sind endogene, 17 - 28 Nukleotide (nt) lange und nicht kodierende, einzelsträngige RNA-Moleküle, welche post-transkriptionell die Expression von mRNA beeinflussen⁴³. Ihre Zahl wird bei Säugetieren auf ungefähr 230, beim Menschen auf über 1000 geschätzt, wobei jede miRNA hunderte mRNAs regulieren kann. MiRNAs könnten somit an der post-transkriptionellen Modifikation von etwa 30 - 50% des gesamten menschlichen Genoms beteiligt sein⁴⁴⁻⁴⁶. Eine öffentliche Datenbank am britischen Sanger Institut archiviert alle bekannten miRNA-Sequenzen. (www.microrna.sanger.ac.uk).

2.4.2 Synthese und Funktion von miRNAs

Im tierischen Genom liegen für miRNAs kodierende Gene häufig als Cluster vor und werden gemeinsam abgelesen. Die meisten humanen miRNAs liegen allerdings isoliert und nicht in Clustern vor^{47,48}. In der Regel werden miRNA-kodierende DNA-Sequenzen zunächst durch das Enzym Polymerase II zum primären Transkript umgeschrieben. Dieses ist mehrere tausend Nukleotide (nt) lang und wird als primäre miRNA (pri-miRNA) bezeichnet. Noch im Kern wird dies dann von der Endonuklease Drosha zu einer 70 - 100 nt langen Vorläufer miRNA (pre-miRNA) prozessiert (Abb.3). Prä-miRNAs haben eine charakteristische Haarnadel-Struktur, bestehend aus einem "loop" und einem doppelsträngigen Ende. Sie werden von Exportin-5 und dessen Cofaktor Ran-

GTP aus dem Zellkern in das Zytosol transportiert. Dort wird die pre-miRNA freigesetzt und durch die Endonuklease Dicer weiter prozessiert (Abb.3). Es entsteht, durch entfernen der Loopregion, ein etwa 21 bp langes, doppelsträngiges Zwischenprodukt. Die reife (*“mature“*) miRNA wird in den *“RNA induced silencing complex“* (RISC), einen Ribonucleoproteinkomplex, inkorporiert. Dieser besteht zum größten Teil aus verschiedenen Argonaut-Proteinen, welche als Endonukleasen den komplementären Strang der miRNA degradieren und die *mature* miRNA freisetzen. Die *mature* miRNA leitet den RISC nun zu ihrer komplementären mRNA. Je nach Grad der Komplementarität wird die Target-mRNA in einem nächsten Schritt degradiert oder in ihrer Translation inhibiert (Abb.3)^{45,49,50}.

In eukaryotischen Zellen liegt in der Regel eine unvollständige Komplementarität vor. Daher wird hier die betreffende mRNA in ihrer Translation inhibiert, was zu einer reduzierten Expression des entsprechenden Proteins führt. Die Bindung der mRNA erfolgt in deren untranslatierten Region am 3'-Ende (3'UTR). Die ersten Nukleotide im Bereich des 5'-Endes der miRNA werden als *“seed“-*Sequenz bezeichnet. Sie sind meist vollständig komplementär zu der Erkennungsstelle der mRNA und vermitteln die Spezifität der Zielgenerkennung⁴⁷. Durch die geringe Größe der miRNAs und die unvollständige Basenpaarung kann eine einzelne miRNA eine Mehrzahl von Transkripten regulieren und es kann auch eine einzelne mRNA von mehreren miRNAs kontrolliert werden⁵¹. Wichtige Funktionen der miRNAs konnten bereits in diversen biologischen Prozessen, wie z.B. Embryonalentwicklung, Zelldifferenzierung, Proliferation, Apoptose, Onkogenese und Angiogenese, gezeigt werden^{49,52}.

2.4.3 Identifizierung von miRNAs und ihren Zielgenen

Zunächst wurden miRNAs hauptsächlich durch Klonierung und Sequenzierung entdeckt⁴⁷. Heute werden bioinformatische Ansätze entwickelt, welche die Entdeckung von miRNAs *in silico* ermöglichen. Auch Zielgene von miRNAs werden über bioinformatische Algorithmen detektiert⁴⁹. Hierbei wird die mature miRNA-Sequenz einer miRNA mit allen bekannten Genen des Menschen, der Maus und der Ratte verglichen. Es wird die 3'UTR-Sequenz der ausgewählten mRNA auf vollständige Komplementarität mit der *seed*-Sequenz einer miRNA hin un-

tersucht. Umgekehrt kann auch eine bestimmte mRNA auf miRNA-Bindestellen untersucht werden. Eine potentielle Bindungsstelle wird nachfolgend nach verschiedenen Kriterien beurteilt: Größe der überlappenden *seed*-Sequenz, Konservierung der Bindungsstelle über Speziesgrenzen hinweg, thermodynamische Stabilität der Bindung und übereinstimmende Vorhersagen verschiedener Algorithmen. Wichtige „*target-prediction*“-Maschinen im Internet sind: MiRanda (www.microrna.org) TargetScan (www.targetscan.org)⁵³, miRWalk (www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk) und PicTar (www.pictar.mdc-berlin.de). In jedem Fall müssen die so berechneten miRNA-mRNA Wechselwirkungen jedoch mittels geeigneter Verfahren wie der real-time PCR oder des Northern Blotting validiert werden⁵⁴.

2.4.4 Überexpression und *knock-down* von miRNAs

Um die Effekte von miRNA-Deregulation im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsprozessen zu untersuchen, besteht die Möglichkeit, bestimmte miRNAs sowohl vermehrt zu exprimieren als auch zu degradieren („*knock-down*“). Für den *knock-down* bestimmter miRNAs *in vitro* werden sogenannte modifizierte anti-miRNA Oligonukleotide verwendet. Diese sind komplementär zur maturen miRNA-Sequenz und an der C2-spezifischen Hydroxylgruppe der Ribose auf verschiedene Weise modifiziert: 1) durch Methylierung zu einem 2′-O-Methyl-Rest (2′-OMe), 2) durch Methoxyethylierung zu einem 2′-O-Methoxyethyl-Rest (2′-MOE) und 3) durch die Verbindung zu Nukleotiden („*locked nucleic acids*“, LNAs).

Auch *in vivo* konnten diese anti-miRNA Moleküle bereits als sogenannte Antagomirs erfolgreich eingesetzt werden, um die Funktion bestimmter miRNAs zu hemmen. Hier werden diese Antagomirs oft durch Veresterung mit Cholesterin konjugiert, um ihre pharmakokinetischen Eigenschaften nach intravenöser Applikation zu verbessern. Um deregulierte miRNA Konzentrationen künstlich wiederherzustellen, kann die zu untersuchende miRNA durch verschiedenen Methoden überexprimiert werden. Dies kann durch Einbringen eines Vektors oder über Transfektion mit einer doppelsträngigen Precursor-Form der miRNA erfolgen⁴⁵.

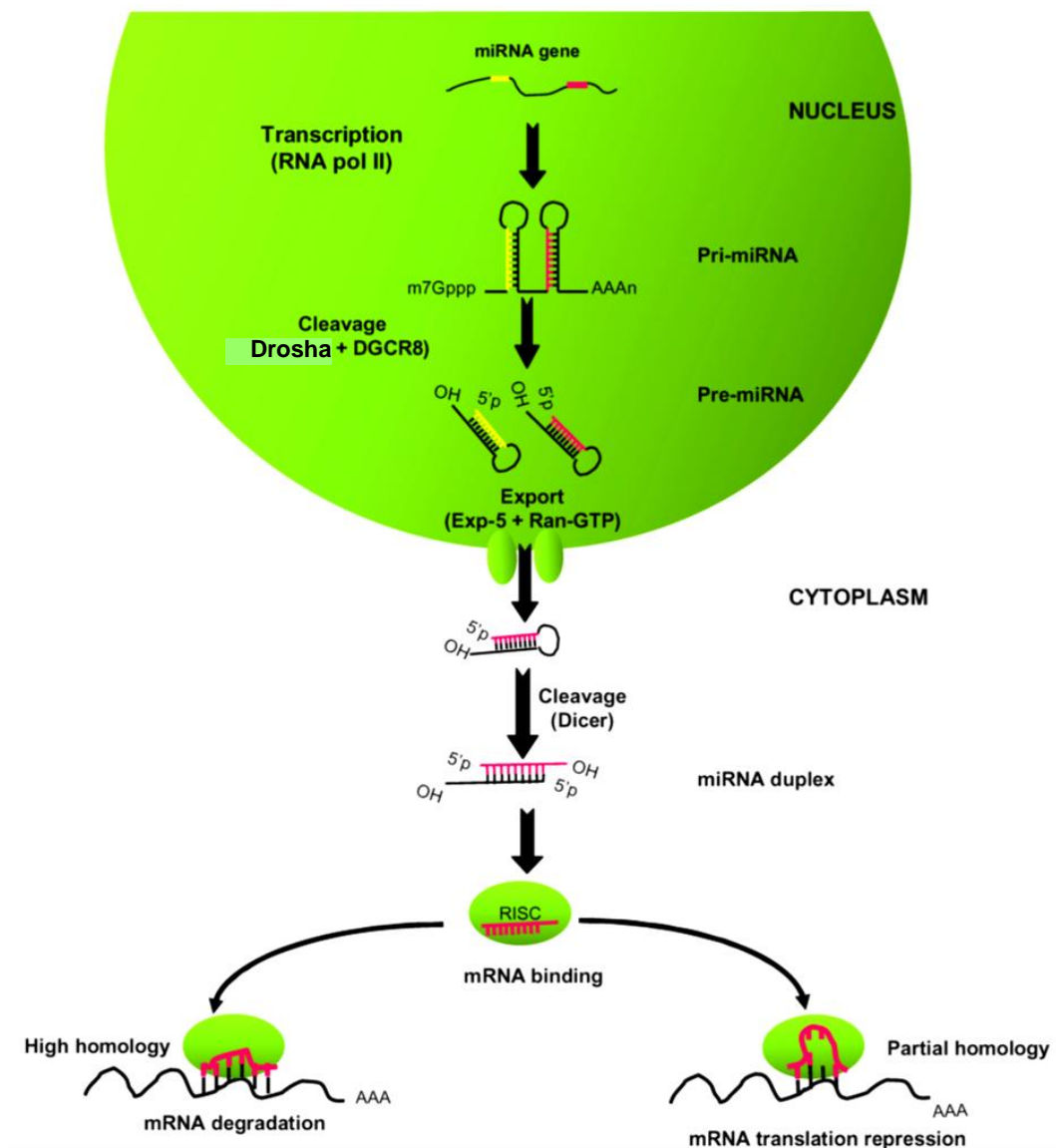


Abbildung 3: miRNA-Synthese und Funktion (aus: Liu et al.; Int J Mol Sci.; 2008)

MiRNAs-kodierende DNA-Sequenzen werden im Zellkern zunächst durch das Enzym Polymerase II (RNA pol II) zum primären Transkript umgeschrieben. Dieses wird als primäre miRNA (pri-miRNA) bezeichnet. Es folgt die Spaltung der primären miRNA in die Vorläufer miRNA (prä-miRNA = pre-miRNA) durch die Endonuklease Drosha. Die entstandene pre-miRNA wird von Exportin-5 und dessen Cofaktor Ran-GTP aus dem Zellkern in das Zytosol transportiert. Dort wird die pre-miRNA durch die Endonuklease Dicer zu einem etwa 21 bp langen, doppelsträngigen Zwischenprodukt weiter prozessiert. Die mature miRNA wird in den RISC (RNA induced silencing complex) inkorporiert. Der komplementäre Strang wird degradiert und die mature miRNA freigesetzt. Die mature miRNA leitet den RISC nun zu ihrer komplementären mRNA. Je nach Grad der Komplementarität wird die Target-mRNA in einem nächsten Schritt degradiert oder in ihrer Translation inhibiert⁴⁵.

2.4.5 Die Rolle von miRNAs bei kardiovaskulären Erkrankungen

Etwa ein Drittel aller miRNAs wird spezifisch in einem bestimmten Gewebe oder einem Zelltyp exprimiert⁴⁷. Mit Hilfe von *in silico* Analysen konnte eine Deregulation spezifischer miRNAs bei bestimmten kardialen Erkrankungen wie Hypertrophie, Myokardinfarkt und kardialer Fibrose detektiert werden^{45,55,56}. Dadurch erhält man einen „miRNA-Fingerabdruck“ der Erkrankung. Da eine miRNA mehrere Zielgene haben kann, könnte die Beeinflussung einer miRNA theoretisch ein ganzes „set“ an Genen und den damit verbundenen pathologischen Phenotyp einer Erkrankung verändern⁵⁶. MiRNAs stellen somit einen interessanten Ansatz zur Beeinflussung pathologischer Signalkaskaden dar.

2.5 Sirtuine

2.5.1 Entdeckung, Eigenschaften, Einteilung

Sirtuine repräsentieren eine Gruppe von Proteinen, die erstmals bei Studien über die Regulation des Fortpflanzungsverhaltens der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt wurde³³.

Es konnte gezeigt werden, dass sie am aktiven Abschalten von Genen („*gene silencing*“) dieser Hefen beteiligt sind. Sirtuine wurden nachfolgend im Genom sehr vieler Organismen von Bakterien und Pilzen über Würmer, Insekten bis hin zu Säugetieren und dem Menschen gefunden. Sie werden nach der Aminosäuresequenz ihrer „*core-domain*“ in fünf verschiedene Klassen eingeteilt (Klasse I-IV und U). Sirtuine sind Deacetylasen, die Lysin-Reste von Histonen aber auch anderen Zielproteinen deacetylieren. Es entsteht neben dem deacetylierten Protein als Nebenprodukt O-Acetyl-ADP-Ribose. Die Enzyme sind hierbei abhängig von dem Kofaktor NAD⁺, welcher im Laufe der Reaktion zu NA umgewandelt wird (Abb. 4). Eine weitere Funktion einiger Sirtuine ist der Mono-ADP-Ribosyl-Transfer. Die Sirtuine der Säugetiere gehören zur Gruppe der Klasse 3 Histondeacetylasen (HDACs), welche, im Gegensatz zu HDACs der Klassen 1 und 2, in Abhängigkeit von NAD⁺ arbeiten. Man unterscheidet sieben Subtypen (SIRT 1-7), die in unterschiedlichen Zellkompartimenten vorliegen und verschiedene biologische Eigenschaften besitzen. Die größte Homo-

logie zu dem bereits gut erforschten Hefe-Sirtuin Sir2 besitzt das säugetierspezifische Sirtuin 1 (SIRT1)⁵⁷.

2.5.2 SIRT1

SIRT1 liegt vorwiegend im Zellkern vor und beeinflusst über Protein-Deacetylierung die Funktion verschiedener Zielproteine, zum Beispiel einiger Transkriptionsfaktoren [unter anderem: “*X-ray repair cross-complementing protein 6*“ (Ku70), “forkhead box type O“ (FoxO)-Proteine, “*tumor repressor*“ p53, “*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*“ (NF-κB) und p73]⁵⁸. Es ist dadurch an diversen physiologischen und pathologischen Abläufen, wie zum Beispiel Zelldifferenzierung, -transformation oder -metabolismus, sowie Stressresistenz und Apoptose beteiligt³³.

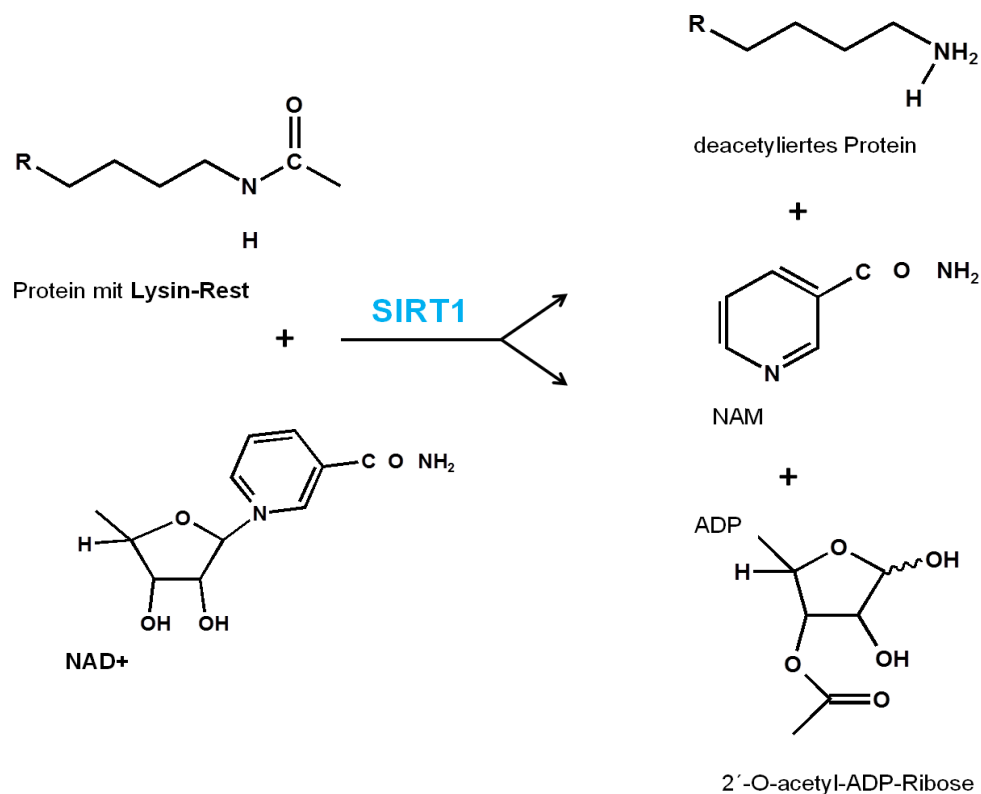


Abbildung 4: Deacetylierungsreaktion durch SIRT1 (modifiziert nach Michan et al.; Biochem J.; 2007)

SIRT1 deacetyliert Lysin-Reste von Zielproteinen mit Hilfe seines Kofaktors Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD⁺). Es entstehen neben dem deacetylierten Protein als Nebenprodukte O-Acetyl-ADP-Ribose und Nicotinamid (NAM)⁵⁷.

Es ist aus Untersuchungen am Mausmodell bekannt, dass es nach verschiedenen pathologischen Stimuli wie Herzinsuffizienz, Bluthochdruck, oxidativem Stress und im Alter zu einer Hochregulation von SIRT1 kommt. Dagegen führt ein *knock-out* von SIRT1 bei Mäusen in 67 % der Fälle postnatal bereits nach sieben Tagen zum Tod und bei Überlebenden kommt es zu hochgradigen Entwicklungsstörungen diverser Organe, unter anderem des Herzens⁵⁹.

Nach experimenteller Induktion von I/R *in vivo* wurde eine Herunterregulation von SIRT1 Protein- und mRNA-Konzentrationen in Mäuseherzen gezeigt. Dies resultierte in einer vergrößerten Infarktfläche. Bei Wiederholung des Versuchs an Mäusen mit einer herzspezifischen Überexpression an SIRT1 wurden im Vergleich signifikant kleinere Infarktareale detektiert. Bei herzspezifischen SIRT1 *knock-out* Mäusen waren signifikant größere Infarktareale zu verzeichnen, im Vergleich zu den Kontrollen nach I/R. Des Weiteren detektierte man eine Hochregulation von antioxidativen und antiapoptotischen Molekülen, jedoch eine Herunterregulation von proapoptotischen Molekülen in Herzhomogenaten von Mäusen mit einer herzspezifischen SIRT1-Überexpression. Gegensätzliche Ergebnisse brachten entsprechende Versuche mit Homogenaten von Herzen von SIRT1 *knock-out* Mäusen⁶⁰.

Eine unterschiedlich stark ausgeprägte, herzspezifische Überexpression von SIRT1 führte dosisabhängig zu unterschiedlichen Veränderungen im Herz. So bedingte die moderate Überexpression kardioprotektive Effekte, wohingegen sich bei hochgradiger Überexpression eher schädliche Auswirkungen auf das Herz zeigten, sowohl phänotypisch in Form von Dilatation und Hypertrophie als auch funktionell und histologisch in Form von Fibrose und vermehrter Apoptose am Herzen. Die Veränderungen waren bei älteren Tieren noch stärker ausgeprägt⁶¹.

In vitro konnte an neonatalen Ratten-Kardiomyozyten gezeigt werden, dass eine Inhibierung von SIRT1 durch NAM zu einer vermehrten Apoptose führt. Im Vergleich dazu konnte bei SIRT1-Aktivierung keine vermehrte Apoptose nachgewiesen werden⁶². Es konnte zudem festgestellt werden, dass SIRT1 über die Beeinflussung der angiogenen Aktivität von Endothelzellen eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielt. So führte ein *knock-down* von SIRT1 in Endothelzellen zu einem Verlust der Fähigkeit zur Sprossung.

Endothelspezifische SIRT1 *knock-out* Mäuse zeigten folgerichtig eine verminderte Fähigkeit zur Angiogenese in Reaktion auf ischämischen Stress^{63,64}.

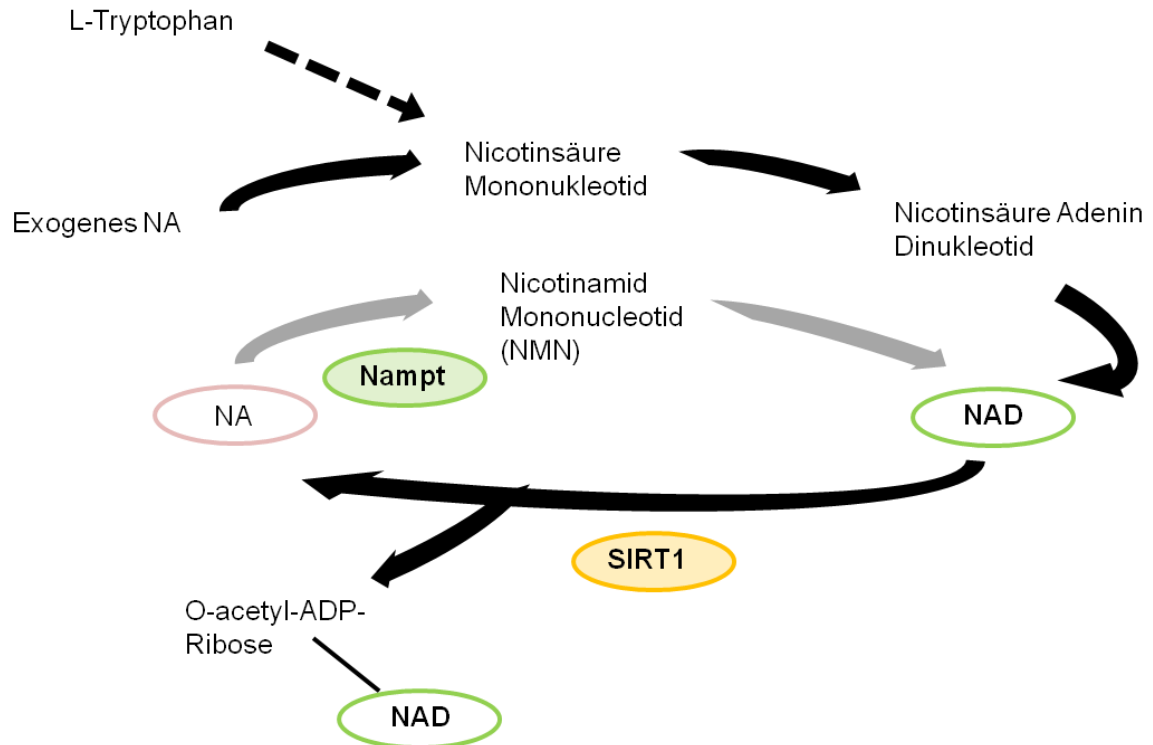


Abbildung 5: Übersicht zu den Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD⁺) Synthesewegen (modifiziert nach Sauve et al.; Annu Rev Biochem.; 2006)

Es gibt im Säugetierorganismus drei beschriebene Wege zur Biosynthese von NAD⁺, zum einen eine *de novo* Synthese von NAD⁺ aus Aminosäuren (z.B. L-Tryptophan und Asparaginsäure), durch die Aufnahme von exogenem Nicotinamid (NA) oder Nicotinamid Ribosid (NR) und schließlich die Möglichkeit eines Recycling-Syntheseweges. Hierbei wird das Abbauprodukt Nicotinamid (NA) durch das Enzym Nicotinamid Phosphoribosyltransferase (Nampt) zu NAD⁺ recycelt³³.

2.5.3 NAD⁺ -Biosynthese und SIRT1-Aktivität

Die Aktivität von Sirtuinen ist grundlegend abhängig von deren Kofaktor NAD⁺. Durch die Bereitstellung von NAD⁺ ist Nampt maßgeblich an der Regulation der SIRT1- Aktivität beteiligt (Abb. 4,5)⁶⁵.

3 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welchen Effekt eine über miRNAs beeinflusste Expression von Nampt auf die Angiogeneseeigenschaften von Endothelzellen und damit auf das Regenerationspotential von myokardialen Gewebe nach Herzinfarkt hat. Ziel war es, eine Möglichkeit zu finden, durch die Förderung von Angiogenese im Bereich des infarzierten Herzmuskelgewebes nach Ausbildung eines Herzinfarktes den Gewebeschaden über die schnelle Wiederherstellung von Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zu reduzieren und damit die Prognose eines Herzinfarktpatienten zu verbessern.

[1] Untersuchungen zur Expression von Nampt nach Myokardinfarkt

Das Protein Nampt wurde in der Literatur bereits mehrfach als protektiver Einflussfaktor im Zusammenhang mit dem Schutz vor Apoptose von Kardiomyozyten sowie der Förderung von Angiogenese von Endothelzellen beschrieben. In initialen Experimenten konnte allerdings gezeigt werden, dass die Expression von Nampt in ischämischen Myokardarealen deutlich verringert war. Die Expression von Nampt sollte daher zunächst nach Myokardinfarkt im Mausmodell (C57BL6) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24, 48 und 72 h) im experimentell durch Ligatur der LAD infarzierten Herzgewebe sowohl auf mRNA-Ebene mittels quantitativer *real-time* PCR als auch auf Protein-Ebene mittels Western Blot bestimmt werden. Da hinsichtlich der Beeinflussung der Angiogeneseaktivität von Endothelzellen durch Nampt diese Zellfraktion im Infarktareal von besonderem Interesse war, sollte die Expression von Nampt nachfolgend in Kardiomyozyten, der endothelzellreichen Zellfraktion sowie in Leukozyten ebenfalls nach Myokardinfarkt separat bestimmt werden.

[2] Beeinflussung der Nampt Expression durch miRNAs

Im nächsten Schritt sollte evaluiert werden, ob die verminderte Expression von Nampt im Myokardinfarkt durch miRNAs reguliert / beeinflusst werden kann. Sollte eine miRNA für die verminderte Expression von Nampt im Infarktareal verantwortlich sein, wäre es möglich, diese zu inhibieren und somit die positiven Effekte von Nampt im Infarktareal therapeutisch zu nutzen. Es sollte daher un-

tersucht werden, ob ein spezifischer miRNA-Inhibitor, nach Auftreten eines Myokardinfarktes verabreicht, über die Beeinflussung der Nampt-Expression einen Effekt auf die Angiogenese im Infarktareal und damit auf die verbleibende Infarktgröße sowie die Pumpfunktion des Herzens haben könnte. Durch *in silico* Analysen konnte miRNA-374 als potentieller Regulator der Nampt-spezifischen mRNA- und Proteinexpression identifiziert werden. Es sollte daher die Möglichkeit einer Einflussnahme auf die Expression von Nampt nach Myokardinfarkt durch miRNA-374 näher untersucht werden. Hierfür sollte zunächst die Expression von miRNA-374 im Infarktareal mittels quantitativer *real-time* PCR bestimmt werden.

[3] *In vitro* Studien an humanen Koronarendothelzellen (*human coronary artery endothelial cells* (HCAEC))

Des Weiteren sollten die funktionellen Effekte der verminderten Nampt-Expression in Endothelzellen sowie der Effekt von miRNA-374 bzw. deren Inhibierung in Bezug auf das angiogenetische Potenzial der Endothelzellen hin näher untersucht werden. Hierfür sollten Studien an HCAEC durchgeführt werden, um die Ergebnisse der *in vivo* Studien auf die Zielspezies Mensch zu übertragen. Zunächst sollte geklärt werden, welcher Faktor, der bei einem Myokardinfarkt auf die Endothelzellen einwirkt, den größten Einfluss auf die Nampt- und miRNA-374-Expression entfaltet. Zu diesem Zweck sollten die Endothelzellen mit verschiedenen Faktoren behandelt und nachfolgend die Expression von Nampt und miRNA-374 untersucht werden. Anschließend sollten die Effekte einer miRNA-374 spezifischen Überexpression bzw. eines *knock-down* und einer Nampt-Inhibierung durch eine *small interfering* RNA (siRNA) auf Proliferation, Migration und Angiogenese-Aktivität von HCAEC näher untersucht werden.

[4] Validierung der Bindung von miRNA-374 an die Nampt-mRNA

Schließlich sollte die *in silico* prognostizierte Bindung von miRNA-374 an deren "*target*" Nampt-mRNA mittels Luciferase-Assay validiert werden.

[5] SIRT1 als ein potentielles *downstream* “*target*“ Molekül von Nampt
Durch die Abhängigkeit der SIRT1-spezifischen Deacetylierungsreaktion von NAD^+ als Cofaktor könnte Nampt durch eine vermehrte NAD^+ -Bereitstellung Einfluss auf die SIRT1-Aktivität ausüben. Da SIRT1 ebenfalls in der Literatur als protektiver Einflussfaktor auf myokardiale Regeneration und als Angiogenesestimulans beschrieben wurde, war es von Interesse, SIRT1 als potentielles downstream “target“-Molekül von Nampt ebenfalls näher zu untersuchen. Hierfür sollte die Expression von SIRT1 nach Myokardinfarkt auf mRNA-Ebene mittels quantitativer *real-time* PCR als auch auf Protein-Ebene mittels Western Blot und schließlich dessen Aktivität mit Hilfe eines Aktivitäts-Assays bestimmt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Akku Pipettierhilfe	HIRSCHMANN, Eberstadt,
Deckgläser	ENGELBRECHT, Edermünde
EDTA-Röhrchen	SARSTEDT, Nümbrecht
EKG YD-910D	NIHON KOHEN CO., Tokyo, Japan
Elektrophoresekammer	BIO-RAD, München
Feinwaage	SARTORIUS, Göttingen
Grobwaage	OHAUS, Pine Brook, NJ, USA
Heizkissen	BEURER, Ulm
Homogenisator (Motorhandstück)	XENOX, Wecker, Luxemburg
Hybridisierungssofen HB-1000	UVP, Upland, CA, USA
Hypoxie-Kammern	BILLUPS-ROTHENBERG INC., Del Mar, CA, USA
iBlot	INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA
Impföse	GREINER, Frickenhausen
Infrarotglühbirne	OSRAM, München
Injektionsnadeln 30 G/26G	BD MICRALANCE, Drogheda, Irland
Infusionskanüle (Braunüle)	B. BRAUN, Melsungen
Klebeband Durapore	3M, St. Paul, MN, USA
Kodan Tinktur forte farblos	SCHULKE&MAYR GmbH, Norderstedt
MetaMorph® Microscopy	MOLECULAR DEVICES, Sunnyvale, CA, USA
Mikroskop Leica MZ 6	LEICA , Wetzlar
Minivent 845	HUGO SACHS, March
MxPro 3000 qPCR	STRATAGENE, Cedar Creek, TX, USA
Nahtmaterial: Monofiler, nicht resorbierbarer Faden 6-0, 7-0, 8-0	ETHICON,JOHNSON&JOHNSON, Norderstedt
Nobaglove Untersuchungshandschuhe	

Latex, puderfrei	NOBA, Wetter
Operationslampe	DR.MACH, Ebersberg
Operationstisch	
(Sonderanfertigung)	WECKERT, Kitzingen
OP-Besteck:	
1. Nadelhalter mit Fixierung	
2. Mikronadelhalter	
3. Mikropinzette mit Haken, gebogen	
4. Mikropinzette ohne Haken	
5. Schere	
6. Arterienklemme	AESCLAP AG & Co. KG, Tuttlingen FST, Foster City, CA, USA
Objektträger	R.LANGENBRINCK, Emmendingen
Pipetten	GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich
Pipettenspitzen	GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich
Pipettierwannen	RATIOLAB, Dreiech
Polypropylen Röhrchen 15ml/50ml	GREINER, Frickenhausen
QIA Shredder Säulen	QIAGEN, Dahlen
Reaktionsgefäße 0,65/1,5/2 ml	EPPENDORF, Hamburg
Röntgenkassette	AMERSHAM PHARMACIA, Braun- schweig
Röntgenfilm	AMERSHAM PHARMACIA, Braun- schweig
Scanner (Scan Maker III)	MICROTEK, Ratingen
Schüttler Duomax 1030	HEIDOLPH, Kehlheim
Schwanenhalslampe	OPTECH, Vaughan, Ontario, Canada
SigmaStat	SYSTAT Software Inc., San Jose, CA, USA
Single Flow Meter	BILLUPS-ROTHENBERG INC., Del Mar, CA, USA
Skalpell, Einweg No 20	FEATHER SAFETY RAZOR CO., Osa- ka, Japan
Roti [®] -Speed-Rührer	CARL ROTH, Karlsruhe
Spritzen 10 ml, 5 ml, 1 ml	B. BRAUN, Melsungen
Stereomikroskop Typ MZ-6	LEICA MICROSYSTEMS, Wetzlar

Suspensionkulturplatten	GREINER, Frickenhausen
Transwell-Platten (24well)	CORNING INC, New York, NY, USA
Zentrifuge	HERAEUS INSTRUMENTS, Hanau
Zellkulturschalen 6, 10 cm	NUNC A/S, Roskilde, Dänemark

4.1.2 Versuchstiere

Mäuse C57BL/6N männliche 25-30 g	CHARLES RIVER Laboratories, Wilmington, MA, USA
-------------------------------------	--

4.1.3 Chemikalien und Pharmaka

Altromin 1324 TPF	ALTROMIN, Lage
Amplite™ Fluorometric HDAC <i>Activity Assay Kit</i>	ABD BIOQUEST INC., Sunnyvale, CA, USA
Acetanhydrid	SIGMA, Steinheim
Anti-Digoxygenin-Antikörper-Konjugat <i>Aqua dest.</i>	ROCHE, Indianapolis, IN, USA BRAUN, Melsungen,
BCIP	ROCHE, Indianapolis, IN, USA
Blocking Reagenz	ROCHE, Indianapolis, IN, USA
BrdU ELISA Kit	ROCHE, Indianapolis, IN, USA
CHAPS 10%	SIGMA, Steinheim
Chloroform	MERCK, Darmstadt
Complet (Proteinaseinhibitor)	ROCHE, Indianapolis, IN, USA
50x Denhardt's	SIGMA, Steinheim
DEPC	ROTH, Karlsruhe
Dulbecco's 1x PBS	PAA LABOR. Linz, Österreich
Dithiothreitol (DTT)	SIGMA, Steinheim
ECL Plus (<i>Western blotting detection reagent</i>)	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
EndoFree®-Plasmid-Maxi-Kit	QIAGEN, Dahlen
Ethanol	RIEDEL-DE HAEN, Seelze
Evans Blue	SIGMA ALDRICH, Steinheim
Fast Red Tabletten	ROCHE, Indianapolis, IN, USA
FCS	INVITROGEN, Karlsruhe

Ficoll-Paque™ Premium 1.084	GE HEALTHCARE Bioscience AB, Uppsala, Schweden,
Formamid	ROTH, Karlsruhe
Gasmischungen	LINDE AG, Pullach
GC5™ <i>competent cells</i>	SIGMA, Steinheim
Gelatin Powder	SIGMA, Steinheim
Glukoselösung 10%	BRAUN, Melsungen,
HCl 37,3% (rauchend)	SIGMA, Steinheim
HEPES-Gel	SIGMA, Steinheim
Heringssperma-DNA	SIGMA, Steinheim
Isofluran-Baxter	BAXTER Deutschland GmbH, Unter schleißheim
Isofluran-Verdampfer	DRÄGERWERK AG, Lübeck
Kaliumchlorid	MERCK, Darmstadt
Ketamin	INRESA, Freiburg
LB-Medium	SIGMA, Steinheim
LB-Agar	SIGMA, Steinheim
Levamisol	SIGMA, Steinheim
<i>LightSwitch luciferase assay</i>	SWITCHGEAR Genomics, Menlo Park, CA, USA
<i>LightSwitch 3'UTR reporter</i>	SWITCHGEAR Genomics, Menlo Park, CA,USA
GoClone Vektor und Kontroll-Vektor	
Lipofectamin	INVITROGEN, Karlsruhe
Lipofectamin RNAiMAX	INVITROGEN, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	SIGMA, Steinheim
Magnesiumsulfat	SIGMA, Steinheim
Matrigel	BD BIOSCIENCE, Heidelberg
Medium-199	INVITROGEN, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	SIGMA, Steinheim
MES-Elektrophoresepuffer	INVITROGEN, Karlsruhe
Methylcellulose	SIGMA, Steinheim
MgCl ₂	SIGMA, Steinheim

Milchpulver	BIO-RAD, München
<i>miRCURY LNA detection probe</i> , 5'DIG und 3'DIG	EXIQUON, Vedbaek, Dänemark
<i>miScript reverse transcription Kit</i>	QIAGEN, Dahlen
<i>miScript SYBR green PCR kit</i>	QIAGEN, Dahlen
MOPS-Elektrophoresepuffer	INVITROGEN, Karlsruhe
NaCl	ROTH, Karlsruhe
0,9 % isotonische NaCl-Lösung	DIACO, Trieste, Italien
NaOH	MERCK, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	SIGMA, Steinheim
NAD ⁺ /NADH <i>quantification kit</i>	BIOVISION, Mountain View, CA, USA
NBT	ROCHE, Indianapolis, IN, USA
NP40 (Igepal Ca-630)	SIGMA, Steinheim
<i>Nucleic acid sample loading buffer</i>	BIO-RAD, München
NuPage 4-12% Bis-Tris-Gele	INVITROGEN, Karlsruhe
<i>NuPage sample reducing agent</i> <i>oligonucleotide</i>	<i>INVITROGEN, Karlsruhe</i>
Opti-MEM	INVITROGEN, Karlsruhe
<i>Pre-miRNA-374 precursor</i>	AMBION, Foster City, CA, USA
Primer für PCR	EUROFINS MWG Operon, Ebersberg
Proteinase-Inhibitor-Tabletten	ROCHE, Indianapolis, IN, USA
Proteinassay (A,B,C)	BIO-RAD, München
Proteinmarker IV PeqGold	PEQLAB, Erlangen
QIAzol Lysis-Reagenz	QIAGEN, Dahlen
Ribonukleinsäure von Hefe	SIGMA, Steinheim
RNeasy kit	QIAGEN, Dahlen
RNeasy MinElute <i>cleanup Kit</i>	QIAGEN, Dahlen
Rompun 2% (Xylazin)	BAYER, Leverkusen
Roti Histofix 4% (PFA)	ROTH, Karlsruhe
SensiMix (PCR Kit)	PEQLAB, Erlangen
SDS 10%	BIO-RAD, München
siRNA Nampt und Kontroll-siRNA	EUROFINS MWG Operon, Ebersberg
<i>Spin columns 10 kDa</i>	BIOVISION, Mountain View, CA, USA

20x SSC	INVITROGEN, Karlsruhe
Saccharose	SIGMA, Steinheim
Stickstoff, flüssig	LINDE AG, München
Tissue-Tek® O.C.T.™ COMPOUND	SAKURA, Zoeterwoude, Niederlande
Temgesic (Buprenorphin)	ESSEX PHARMA, München
Trietholamin	ROTH, Karlsruhe
Tris	ROTH, Karlsruhe
Trizma base	SIGMA, Steinheim
Trypsin	INVITROGEN, Karlsruhe
Tween 20	
(Polyoxyethylenesorbitan Monolaureat)	SIGMA, Steinheim
Anti-miRNA-374 mi RNA-Inhibitor	VBC Biotech, Wien, Österreich
VEGF	R+D SYSTEMS, Minneapolis, MN, USA
Wasser mit DEPC	SIGMA, Steinheim
WST-1	ROCHE, Indianapolis, IN, USA

4.2 Methoden

4.2.1 Tierexperimentelle Arbeiten

Die in der Studie verwendeten C57BL/6N Mäuse wurden von der Firma Charles River (Charles River, Sulzfeld) bezogen. Es handelte sich um männliche, 8 - 12 Wochen alte, 25 - 30 g schwere Mäuse. Die Versuchstiere wurden von den Tierpflegern des Zentrums für Innere Medizin in den Tierställen des Hauses C (Seltersberg, Gaffkystraße, 35392 Gießen) fachgerecht betreut. In den Stallungen wurde eine Temperatur von $22 \pm 2^\circ\text{C}$, eine Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 10 \%$ und ein 12 : 12-stündiger Tag-/Nacht-Rhythmus gewährleistet. Die Ernährung bestand aus kommerziell erhältlichen Futterpellets der Firma Altromin sowie Wasser *ad libitum*. Die Versuchstiere wurden, je nach Anzahl der Tiere, in Käfigen nach Euronorm-I „lang“ und „superlang“ sowie Euronorm-II „lang“ gehalten. Die nachfolgend beschriebenen Tierversuche erfolgten nach entsprechender Genehmigung durch das Regierungspräsidium Gießen (Antrag mit dem Aktenzeichen: GI 104/2011, „Myokardinfarkt SIRT1 Maus“).

4.2.2 Experimenteller Myokardinfarkt

Zur Untersuchung der Expression von Nampt und SIRT1 nach Myokardinfarkt wurde bei C57BL/6N-Mäusen experimentell ein Myokardinfarkt erzeugt. Dies geschah durch Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* der *Arteria coronaria sinistra* (RIVA, englisch: *left anterior descending coronary artery* (LAD)). Das murine Herz wird durch eine rechte und eine linke Koronararterie versorgt, die beide aus der *Aorta* entspringen⁶⁶. Bei der Maus gibt es zwei Variationen in der Anatomie der *Arteria coronaria sinistra*. Diese verläuft entweder als ein größeres Gefäß Richtung *Apex cordis* oder teilt sich in ihrem Verlauf in zwei Äste auf. Die Höhe der Ligatur der LAD korreliert direkt mit der Größe des daraus resultierenden Myokardinfarktes⁶⁷. Eine Ligatur etwa 0,3 cm unterhalb der Spitze des linken Vorhofes ergibt einen signifikanten, reproduzierbaren Infarkt von im Mittel 38,6% des linken Ventrikelmyokards^{66,68}.

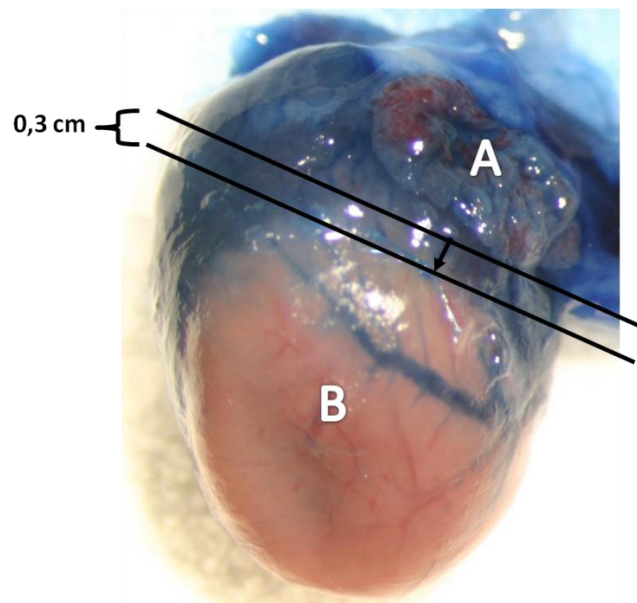


Abbildung 6: Höhe der Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* der *Arteria coronaria sinistra* (LAD)

Eine Ligatur etwa 0,3 cm unterhalb der Spitze des linken Vorhofes (A) ergibt einen signifikanten, reproduzierbaren Infarkt von im Mittel 38,6 % des linken Ventrikelmyokards (B)⁶⁶

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Herzinfarktmodell an der Maus wurde erstmals 1995 beschrieben⁶⁹. In unserer Arbeitsgruppe wurde die dort dargestellte Operation nach den Erfahrungen und den apparativen Möglichkeiten unseres Labors modifiziert. Hierfür erfolgte zunächst eine Allgemeinanästhesie

durch die intraperitoneale Injektion einer Ketamin (50 mg/ml) - Xylazin (20 mg/ml) - Natriumchlorid (0,9 %) (NaCl) Mischung (1:4:1) mit einer Dosierung von 0,004 ml/g Körpergewicht. Zur Volumensubstitution erhielt die Maus zudem je einen 200 µl Bolus einer isotonen, 0,9 % Kochsalz- sowie 5 % Glukoselösung als *subcutane* Injektion. Die Analgesie erfolgte durch eine *subcutane* Applikation von Buprenorphin (0,3 mg/ml) in einer Dosierung von 0,01 mg/kg. Nach Erreichen des chirurgischen Tolaranzstadiums der Anästhesie erfolgte die endotracheale Intubation. Hierfür wurde die Maus mit den oberen vorderen Schneidezähnen an einer waagrechten Halteapparatur aufgehängt. Eine von vorne gegen die Kehlkopfregion der Maus gerichtete Schwanenhalslampe ermöglichte beim Blick von oben durch die Maulöffnung die Darstellung der Stimmritze der Maus (Abb. 7).

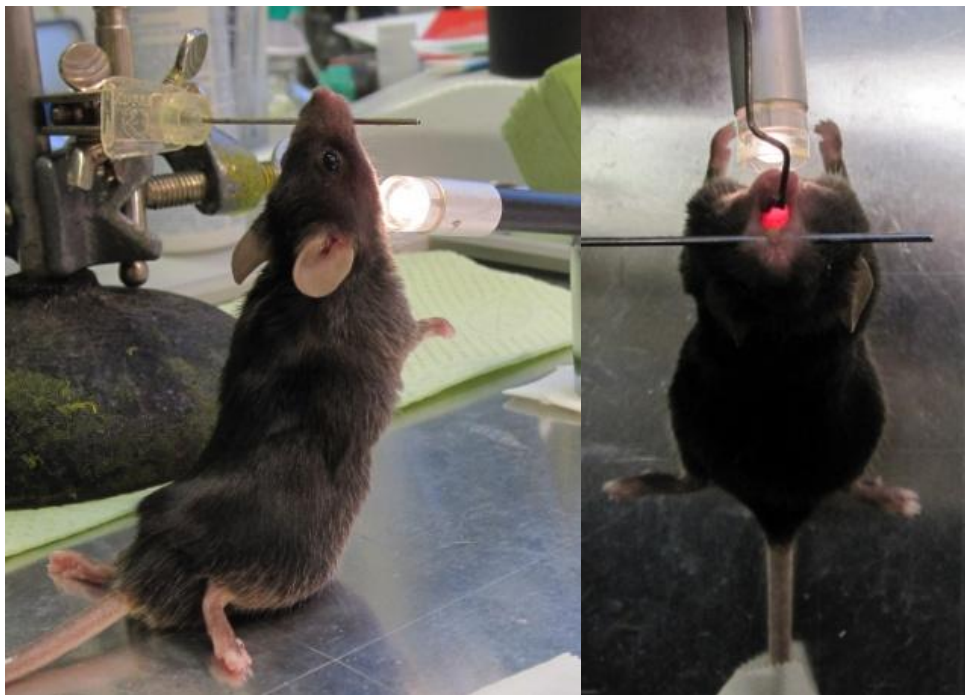


Abbildung 7: Lagerung zur Intubation

Ein Einhängen der Maus mit den oberen vorderen Schneidezähnen an einer waagrechten Halteapparatur ermöglichte durch eine von vorne gegen die Kehlkopfregion der Maus gerichtete Schwanenhalslampe beim Blick von oben durch die Maulöffnung die Darstellung der Stimmritze der Maus für die endotracheale Intubation.

Zur besseren Darstellung der Region wurde ein modulares Stereomikroskop mit bis zu 6:1 Zoom benutzt. Die endotracheale Intubation erfolgte mit Hilfe einer 20G Venenverweilkanüle. Die künstliche Beatmung erfolgte über einen Nage-

tier-Ventilator mit 0,4 l/min Sauerstoff, bei einer Frequenz von 180/min und einem Atemzugvolumen von 150 µl. Während der gesamten Operation wurde eine Sauerstoffsättigung von 94 - 98% im arterialisierten Blut angestrebt. Die Narkose wurde mit 5 % Isofluranbeimischung zum Atemgas vertieft. Die Maus wurde dann auf einem beheizbaren Kleintier-Operationstisch in Rückenlage mit Klebestreifen an den Pfoten fixiert, wobei die Hintergliedmaßen zunächst um 180° gedreht wurden. Der Vorteil dieser Lagerung bestand darin, dass die linke Thoraxhälfte, und damit auch der linke Teil des Herzens, in eine optimale Lage für den geplanten Eingriff gebracht werden konnten. Die Körperkerntemperatur wurde rektal gemessen und über ein in den Operationstisch integriertes Heizkissen servokontrolliert zwischen 37° und 38°C gehalten. Ein Elektrokardiogramm (EKG) nach Einthoven zur Überwachung der Herzfunktion wurde von den Extremitäten der Maus abgeleitet. Hierfür wurde eine mit rot markierte Elektrode mit integrierter Kanüle im Bereich der rechten Achsel der Maus *subcutan* platziert, eine weitere Elektrode mit gelber Markierung wurde im Bereich der linken Achsel platziert, die nächste mit grüner Markierung im Bereich der linken Leiste und eine letzte mit schwarzer Markierung im Bereich der rechten Leiste zur Erdung (Abb. 8).

Die weiteren Schritte der Operation fanden unter stereomikroskopischer Kontrolle (Zoom bis zu 6:1) statt. Nach Enthaarung des Operationsfeldes mit Hilfe eines Skalpells erfolgte der Hautschnitt im Mittelpunkt einer gedachten Linie zwischen *Processus xyphoideus* des *Sternum* und Schultergelenk. Die darunter befindlichen Muskellagen wurden schichtweise stumpf durchtrennt, anschließend mit einer Nadel-Fadenkombination eines nichtresorbierbaren Fadens durchstoßen, nach beiden Seiten retrahiert und der Faden mit Klebeband auf dem Operationstisch fixiert. Die Eröffnung des Thorax erfolgte im 2. Interkostalraum durch stumpfe Durchtrennung der Zwischenrippenuskulatur mittels einer feinen Pinzette. Die 2. und 3. Rippe wurden nachfolgend ebenfalls mit Nadel-Fadenkombination zu beiden Seiten retrahiert fixiert.

Es erfolgte die stumpfe Eröffnung des Perikards. Man erhielt so die Sicht auf den linken Teil des Herzens mit linkem *Atrium* und linkem Ventrikel. Unter vorsichtiger Verdrängung des Atriums nach *cranial* wurde der Verlauf der *Arteria coronaria sinstra* mit dem Abgang der LAD dargestellt (Abb. 9).



Abbildung 8: Lagerung der Maus für die EKG-Ableitung

Plazierung der Elektroden wie folgt: eine mit rot markierte Elektrode mit integrierter Kanüle im Bereich der rechten Achsel, eine weitere Elektrode mit gelber Markierung im Bereich der linken Achsel, eine weitere Elektrode mit grüner Markierung im Bereich der linken Leiste und eine letzte mit schwarzer Markierung im Bereich der rechten Leiste.

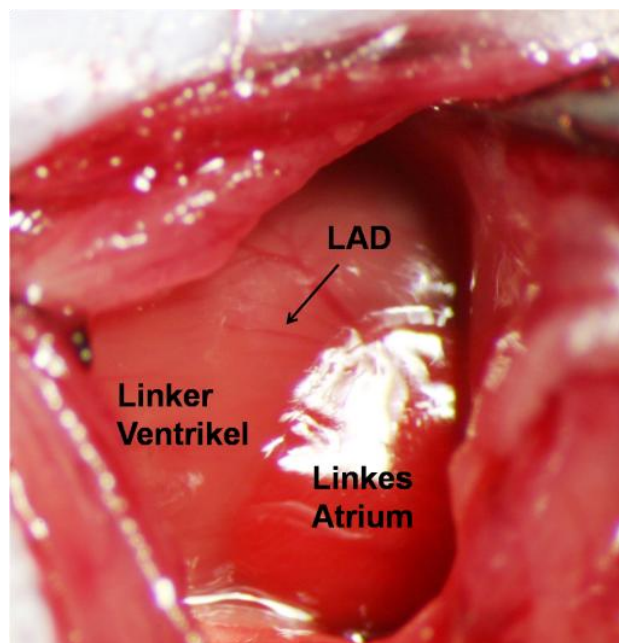


Abbildung 9: Operationssitus, Blick auf das Herz

Man sieht den linken Teil des Herzens mit linkem Atrium (rechts unten im Bild) und linkem Ventrikel (links oben im Bild). Unterhalb des Atriums ist der Verlauf der Arteria coronaria sinstra mit dem Abgang des Ramus interventricularis anterior (LAD) mit einem Pfeil markiert.

Die Ligatur der LAD erfolgte etwa 2-3 mm distal des Atriumappendix, direkt nach ihrem Abgang aus der Koronararterie, oberflächlich mit einer 8-0er Nadel-Fadenkombination. Eine suffiziente Unterbrechung des Blutflusses konnte durch Erblassen des von der LAD versorgten Bereiches des Myokards und durch die Veränderungen im EKG nachgewiesen werden (Abb. 10). Im Falle der Kontrolloperation wurde der Faden lediglich an derselben Stelle durch das Myokard gezogen, ohne Durchführung der Ligatur (= *sham* Operation). Der Brustkorb wurde nachfolgend über einen Zeitraum von 20 min durch Zurückverlagerung von Rippen und Muskulatur verschlossen und die Operationswunde mittels eines mit NaCl getränkten Tupfers feucht gehalten. Waren die EKG-Veränderungen nach 20 min eindeutig im Sinne eines Myokardinfarktes, so wurde der Thorax durch 2 - 3 Einzelknopfnähte zwischen 2. und 3. Rippe mit einer 7-0er Nadel-Fadenkombination verschlossen. War dies nicht der Fall, so wurde eine weitere Ligatur gesetzt. Die Muskulatur wurde in ihre Ausgangsposition zurückverlagert und genauso wie die Haut mit einer fortlaufenden Naht mit einer 6-0er Nadel-Fadenkombination adaptiert. Nach Beginn spontaner Atmungsaktivität konnte die Maus extubiert werden. Die Tötung der Tiere mit Entnahme der Herzen und anschließender Exzision sowie Weiterverarbeitung des infarzierten Gewebes erfolgte, wie in Kap. 4.2.4 beschrieben, nach 24, 48 oder 72 h. Für jeden Zeitpunkt wurden 12 Tiere mit sowie 10 Tiere ohne LAD-Ligatur (*sham* OP) operiert. Die Operation dauerte pro Maus etwa 20 min.

4.2.3 Das Elektrokardiogramm nach Myokardinfarkt

Das Elektrokardiogramm (EKG) diente neben dem optisch sichtbaren Erblassen des infarzierten Myokards zur Verifizierung einer erfolgreichen Ligatur der LAD. Des Weiteren konnte das Herz-Kreislauf System hierdurch während der gesamten Operation überwacht werden. Das Elektrokardiogramm (nach Einthoven) der Maus weist einige besondere Charakteristika auf, die es vom EKG des Menschen unterscheidet. Zum einen kann oft kein klar voneinander abgegrenztes ST-Segment beobachtet werden, zum anderen sind die T-Wellen oft nicht vom QRS-Komplex zu trennen⁷⁰. Nach Myokardinfarkt werden im Maus-EKG zunächst eine Vergrößerung der R-Zacke und eine Hebung des ST-Segmentes

sichtbar. Diese beiden Veränderungen verstärken sich über die Zeit und sind spätestens 20 min nach Infarkt deutlich zu erkennen (Abb. 10)

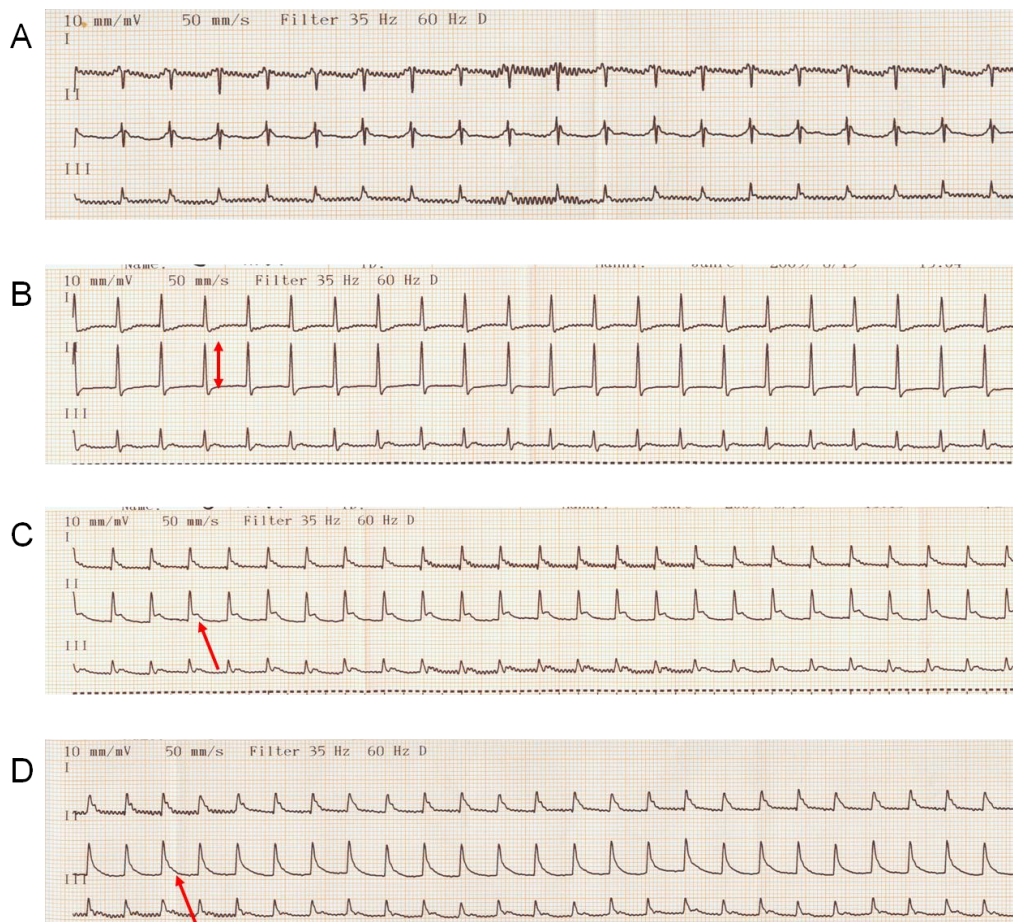


Abbildung 10: Das Elektrokardiogramm (EKG) einer Maus vor (A) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt (B-D)

- A:** Darstellung der Ableitungen I - III nach Einthoven eines physiologischen EKGs der Maus. Es ist kein klar voneinander abgegrenztes ST-Segment zu sehen, die T-Wellen sind nicht klar vom QRS-Komplex zu trennen.
- B:** EKG 5 min nach Ligatur des Ramus interventricularis anterior der Arteria coronaria sinistra (LAD). Es entsteht zunächst eine Vergrößerung der R-Zacke
- C:** EKG 15 min nach Ligatur. Es kommt zu einer Hebung des ST-Segmentes
- D:** EKG 30 min nach Ligatur. Verstärkte ST-Hebung⁷⁰.

4.2.4. Entnahme der Herzen

Für die Entnahme der Herzen wurde die Maus zunächst erneut, wie in Kap. 4.2.2 beschrieben, anästhesiert und an den Extremitäten in Rückenlage fixiert. Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums erfolgte die Eröffnung der Bauchhöhle durch einen Y-förmigen Schnitt mit einer Schere nach Anheben der

Bauchdecke mit einer feinen Pinzette. Nach Verlagerung des Darmkonvolutes nach lateral und extrakorporal wurde der abdominale Abschnitt der Vena cava dargestellt. Parallel zu dieser verläuft auf der linken Seite der abdominale Abschnitt der Aorta. Mit einer 1.0 ml-Spritze mit 30G Kanüle wurde die Vena cava caudalis kanüliert und die maximale Menge an Blut (500 - 700 μ l) entnommen (Abb. 11). Dieses wurde in ein mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) benetztes Blutröhrchen verbracht und zur Gewinnung des Plasmas bei 13.000 U/min und Raumtemperatur für zwei min zentrifugiert. Es folgte die Platzierung einer Kanüle in die Aorta zur Perfusion des Kreislaufs mit Evans-Blue, einem inerten Farbstoff mit hoher Bindungsaffinität zu Albumin. Dies diente indirekt der optischen Darstellung des Infarktareals: durch die Ligatur der LAD wird das von diesem Gefäß versorgte Myokardareal nicht mehr mit Blut perfundiert und somit gelangt auch der über das Kreislaufsystem injizierte blaue Farbstoff nicht in das Gebiet des Myokardinfarktes. Es kommt in der Folge zu einer Blaufärbung des Herzens, das Infarktareal bleibt frei von Farbe und lässt sich somit gut erkennen. Hierfür wurde zunächst die gemeinsame bindegewebige Hülle von Aorta und *Vena cava* eröffnet.

Die *Aorta* wurde vorsichtig von ihrer Verbindung zur *Vena cava* freipräpariert und durch Unterstechen mit einer 6-0er Nadel-Fadenkombination vorgelagert, um das nachfolgende Vorlegen eines Knotens um die Aorta mit einer 8-0er Nadel-Fadenkombination zu erleichtern. Nach Eröffnen der Aorta mittels Schere wurde eine stumpf geschliffene 26G Nadel mit Halteapparatur in das Gefäß eingeführt (Abb. 12). Der vorgelegte Knoten wurde verschlossen und die Kanüle so im Gefäß fixiert. Nach Eröffnen der *Vena cava* wurde das Gefäßsystem retrograd zunächst mit 0,9 % NaCl-Lösung durchgespült und dann mit zwei ml einer 0,5 % Evans Blue Lösung perfundiert.

Die erfolgreiche Perfusion des Gefäßsystems wurde an der Blaufärbung von Haut und anderen Organen festgemacht (Abb. 13). Zur Entnahme des Herzens wurde der *Thorax* von *caudal* über das *Diaphragma* und über Durchtrennung der Rippenverbindung am *Sternum* eröffnet. Das Herz wurde entnommen und zunächst in 0,9 % NaCl von äußerer und innerer Farbverunreinigung gesäubert, danach das Infarktareal dargestellt und aus dem Herz herausgeschnitten.



Abbildung 11: *Kanülierung der abdominalen V. cava zur Blutentnahme*

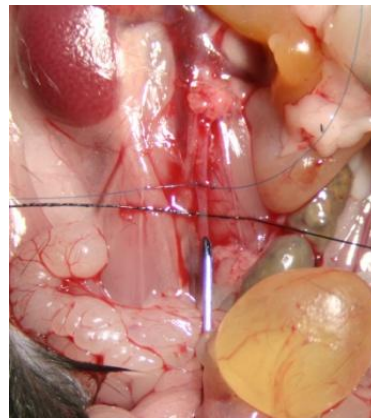


Abbildung 12: *Platzieren der Kanüle in die Aorta descendens zur retrograden Färbung des Kreislaufs und damit des Herzens mit Evans Blue (Farbstoff) zur Negativdarstellung des kardiaalen Infarktareals.*

Der perfundierte Bereich des Herzens färbte sich durch den Farbstoff tiefblau ein, lediglich der Versorgungsbereich der LAD blieb durch die Ligatur von einer Färbung frei und stellte sich als blasse Region unterhalb der Ligatur dar (Abb. 14).

Die *sham* operierten Herzen wurden auf die gleiche Art und Weise entnommen. Es wurde hier ein dem Infarktberich entsprechender Bereich der Vorderwand des linken Ventrikels entnommen. Nach Wiegen des Infarktareals und Aufteilung in zwei Teilstücke von jeweils ca. 10 mg wurden die Gewebestücke mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Ebenso wurde mit dem abzentrifugierten Plasma verfahren.



Abbildung 13: Retrograde Perfusion des Kreislaufsystems mit Evans Blue Farbstoff zur Darstellung des kardialen Infarktareals nach LAD-Ligatur

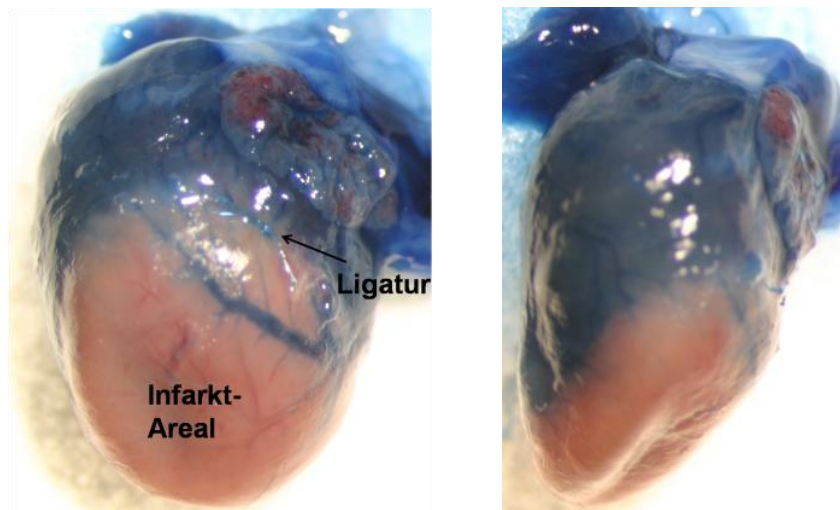


Abbildung 14: Herz gefärbt mit systemisch appliziertem Evans Blue Farbstoff. Negativdarstellung des aufgrund der LAD-Ligatur nicht mehr perfundierten Infarktareals in frontaler (links) und lateraler (rechts) Ansicht. Der perfundierte Bereich des Herzens färbt sich durch den Farbstoff tiefblau ein und lediglich der Versorgungsbereich der LAD bleibt durch deren Ligatur von einer Färbung frei und stellt sich als blasse Region unterhalb der Ligatur dar.

4.2.5 Western Blot

Der Western Blot stellt ein biochemisches Verfahren zur Darstellung bzw. zum Nachweis bestimmter Proteine z.B. in einer Gewebeprobe dar. In der vorliegenden Arbeit sollte der Gehalt an Namp und SIRT1 im Infarktareal zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt werden. Hierfür wurde aus den entnommenen Gewebeproben zunächst das Gesamtprotein isoliert.

4.2.6 Proteinisolierung

Die ca. 10 mg schweren Gewebeproben wurden jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in je 300 µl RIPA-Puffer mittels eines Speed-Rührers homogenisiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 U/min für 15 min bei 4°C, um unaufgeschlossene Zellen und größere Zelltrümmer von der restlichen Probe abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, bis zur Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Lysepuffer (RIPA Puffer): (Lagerung bei +4°C)

- 500 ml PBS ohne Calcium und Magnesium
- 5 ml NP-40
- 2,5 g Natriumdesoxycholat
- 5 ml 10 % SDS
- 1/8 Proteinase-Inhibitor-Tablette (1 Tablette/100ml)
- 10 µl DTT (500 mM)

4.2.7 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels des *DC Protein Assay*[™] der Firma BioRad. Dieser beruht auf einer modifizierten Variante der Methode nach Lowry⁷¹. Als interner Standard fand Bovines Serum Albumin (BSA) in Form einer Standardkurve (0,17 µg; 0,35 µg; 0,7 µg, 1,4 µg) Verwendung, um den Proteingehalt der kardialen Gewebeproben in µg/µl zu bestimmen.

4.2.8 Primärantikörper

Tabelle 1: Primär-Antikörper für Western Blot Analyse spezifischer Proteine

	SIRT1	SIRT1	Nampt	β-Tubulin	CDK-4	GAPDH
Wirt	Kaninchen	Kaninchen	Kaninchen	Kaninchen	Kaninchen	Kaninchen
Isotyp	IgG poly- klonal	IgG poly- klonal	Ig G poly- klonal	IgG mono- klonal	IgG poly- klonal	IgG poly- klonal
Konzentration	1 mg/ml	200 µg/ml	1,25 µg/ml		200 µg/ml	200 µg/ml
Verdünnung	1:1.000	1:2.000	1:800	1:20.000	1:1.000	1:2.000
Lager- temperatur	-20°C	4°C	-20°C	-20°C	-20°C	-20°C
AK-Typ Firma	07-131, Milipore	Sc-15404, Santa Cruz	Ab58640, Abcam	1879-1, Epitomics	Santa Cruz sc- 260	Sc-25778, Santa Cruz
Molekular- gewicht	120 kDa	120 kDa	54 kDa	50 kDa	34 kDa	39 kDa

4.2.9 Sekundärantikörper

Tabelle 2: Sekundär-Antikörper für Western Blot

	Anti-Rabbit
Wirt	Ziege
Isotyp	IgG
Konzentration	400 µg/ml
Verdünnung	1:2.000
Lagertemperatur	4°C
AK-Typ, Firma	Sc-2030, Santa Cruz

4.2.10 Proteinaufbereitung

Zur Proteinaufbereitung wurden zunächst alle Proben mit der entsprechenden Menge an *Aqua dest.* in ein Reaktionsgefäß gegeben, um eine einheitliche Menge von 20 µg Protein und ein Volumen von 12,5 µl pro Probe einsetzen zu können. Zur Denaturierung der Proteine wurden zu den Proben 1:10 DDT (500 mM) zugegeben, um Disulfidbrücken zu reduzieren, sowie 4 x Ladepuffer. Im Ladepuffer war Natriumdodecylsulfat (SDS) enthalten; dabei handelt es sich um

ein anionisches Tensid, welches die Proteine umhüllt und somit deren Eigenladung kompensiert, so dass alle Proteine auf eine einheitliche negative Ladung gebracht werden. Die Proben wurden nun mittels Schüttler vermischt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Bei diesem Schritt werden Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Lösen von Wasserstoffbrücken und das Strecken der Moleküle aufgebrochen.

4.2.11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine z.B. einer Gewebeprobe entsprechend ihrer Größe in einem polymerisierten, kombinierten Sammel- und Trenngel aufgetrennt. Die Proteine der kardialen Gewebeproben wurden bereits durch die Zugabe von SDS im Verhältnis 1,4 g SDS pro g Protein auf eine einheitliche negative Ladung gebracht und konnten nun im nächsten Schritt in einem elektrischen Feld lediglich ihrer Größe nach separiert werden. Die Elektrophoresekammer bestand aus einer oberen und einer unteren Teilkammer in einem vertikalen System. Zwischen den beiden Glasplatten befand sich das Polyacrylamidgel (kombiniertes Sammel- und Trenngel), welches die Verbindung zwischen den beiden Kammern darstellte und den Stromfluss von Kathode zu Anode vermittelte. Die Kammern wurden mit Elektrophoresepuffer (MOPS für Proteine > 60 kDa, MES für Proteine < 60 kDa) gefüllt. Als Nächstes wurden die Geltaschen jeweils mit dem Proteinlysate einer kardialen Gewebeprobe bzw. 10 µl eines Markers (Gemisch hochreiner Proteine bekannter Molekulargewichte) beladen. Die vertikale elektrophoretische Trennung wurde für 75 min bei 185 V durchgeführt.

4.2.12 Transfer

Nach Entnahme des SDS-Gels aus der Elektrophoresekammer wurden die im Gel aufgetrennten Proteinbanden mittels iBlot®-System (*dry* Western Blot; Invitrogen) nach Herstelleranweisung auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran transferiert. Hierbei wurde ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, was dazu führte, dass die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen wurden. Aufgrund ihrer hydrophoben Wechselwirkungen blieben sie dann auf der Membran haften und konnten mittels spezifischer Antikörper und

nachfolgender Chemielumineszenz-Reaktion (Kap. 4.2.13) sichtbar gemacht werden.

4.2.13 Immundetektion der aufgetrennten Proteine

Waschpuffer:

10 x TBS-T
24,2 g Tris base
80 g NaCl
0,1 % Tween 20; pH 7,68 (mit HCl)
ad 1 l H₂O

Blocklösung:

10 x TBS-T
5 % Magermilchpulver

Nach der Überführung der Polyvinylidenfluorid-Membran in ein 50 ml Greiner-Reaktionsgefäß erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit einer Blocklösung, um potentielle unspezifische Bindungsstellen der spezifischen Antikörper abzusättigen. Als nächstes wurde die Membran mit dem für das Zielprotein spezifischen Primärantikörper inkubiert. Dieser wurde zunächst in der entsprechenden Konzentration (siehe Tab. 1) in der Blocklösung verdünnt und dann bei 4°C über Nacht mit der Membran inkubiert. Am nächsten Tag folgten drei Waschschrte mit Waschpuffer für jeweils 10 min bei Raumtemperatur, wodurch nicht gebundene Antikörpermoleküle (Immunglobuline) entfernt wurden. Es folgte die Inkubation der Membran mit dem entsprechenden Sekundärantikörper in der benötigten Konzentration (siehe Tab. 2) in Blocklösung nach Angaben des Herstellers für 60 min. Danach folgten erneut drei Waschschrte mit Waschpuffer. Für die Detektion der Zielproteine wurde das Chemilumineszenz-System (ECL+) der Firma Amersham verwendet, worin die Membran für 5 min inkubiert wurde. Dabei werden durch die Antikörper-gebundene Meerrettichperoxidase (HRP) sowie Wasserstoffperoxid (H₂O₂) Lumigen PS-3 Acridan-Moleküle oxidiert, welche ihrerseits mit H₂O₂ reagieren, wodurch eine intensive Chemilumineszenz mit maximaler Emission bei 430 nm entsteht. Die

Membran wurde anschließend in einer Dunkelkammer einem hochsensitiven Röntgenfilm exponiert. Nach der Entwicklung des Films konnten die nun sichtbaren gewordenen, antikörpermarkierten Banden nach Einscannen am Computer densitometrisch und semiquantitativ ausgewertet werden.

4.2.14 Isolierung von murinen Kardiomyozyten nach Myokardinfarkt

Um die Regulation von Nampt und miRNA-374 (siehe Kap. 4.2.17) auf zellulärer Ebene weiter zu differenzieren, wurde deren Expression in aus Mäuseherzen isolierten Kardiomyozyten (CMC) und der verbleibenden, endothelzell (EC-)reichen Zellfraktion des Mäuseherzens bestimmt. Es sollte somit festgestellt werden, in welcher Zellfraktion die Expression von Nampt bzw. miRNA-374 dominierend stattfindet. Die Isolierung von Kardiomyozyten aus Mauserherzen wurde in einer Kooperation mit Mitarbeitern des Labors der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Schlüter des Physiologischen Instituts des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Die Zellisolierung erfolgte 48 h nach Induktion eines Myokardinfarktes bzw. von kontrolloperierten Tieren. Die Methode wurde nach Schlüter et al.⁷² durchgeführt. Aus dem resultierenden Zellpellet wurden Gesamt-RNA sowie Gesamt-miRNA isoliert und mittels quantitativer *real-time* PCR amplifiziert sowie ausgewertet (siehe hierzu Kap. 4.2.17 und folgende).

4.2.15 Isolierung von Leukozyten aus venösem Blut

Da es nach Induktion eines Myokardinfarkts im Rahmen einer Entzündungsreaktion zu einer Einwanderung von Leukozyten in das Infarktareal kommt, sollte dieser Zellfraktion in der zellulären Differenzierung bei der Regulation von Nampt und miRNA-374 neben Kardiomyozyten und Endothelzellen ebenfalls Rechnung getragen werden. Da es jedoch schwierig ist, eingewanderte Leukozyten direkt aus dem Infarktareal zu isolieren, wurden als Näherung die Leukozyten aus dem peripheren venösen Blut nach Myokardinfarkt isoliert. Die Entnahme von venösem murinem Blut erfolgte 48 h nach Induktion eines Myokardinfarktes durch Punktion der *V. cava caudalis* nach Eröffnung des Abdomens unter Narkose (siehe Kap. 4.2.4). Die Isolierung von Leukozyten, genauer ge-

sagt der mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten), wurde nach dem Protokoll des Ficoll-Paque™ Premium 1.084 der Firma GE Healthcare durchgeführt. Dieses Verfahren basiert auf einer Gradientenzentrifugation, wobei die Leukozyten aufgrund ihrer Dichte im Ficoll-Gradienten von anderen Blutzellen (Erythrozyten, Granulozyten) und toten Zellen getrennt werden. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Blut 1:1 mit PBS (mit 2 % FCS) vermischt und auf eine dem Blutvolumen entsprechende Menge Ficoll in einem Reaktionsgefäß geschichtet. Das Gemisch wurde für 30 min bei Raumtemperatur (RT) mit 400 U/min zentrifugiert. Die „weiße Phase“ (der sogen. „buffy coat“) wurde vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und in ein weiteres Reaktionsgefäß mit PBS (mit 2 % FCS und 1 mM EDTA) überführt. Die Zellen wurden nun durch eine milde Zentrifugation bei 120 U/min für 10 min bei RT pelletiert, zum Waschen erneut in PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert (10 min bei RT und 120 U/min). Nachfolgend wurden aus dem Pellet RNA sowie miRNA isoliert und mittels quantitativer *real-time* PCR amplifiziert sowie analysiert (siehe Kap. 4.2.17 und folgende).

4.2.16 Arbeiten mit Endothelzellen aus humanen Koronararterien (HCAECs)

Nach ersten Erkenntnissen über die regulierte Expression von Nampt, SIRT1 und miRNA-374 am Mausmodell sollten weiterführende Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses der Expression von Nampt und miRNA-374 auf die Angiogeneseaktivität von Endothelzellen nach Myokardinfarkt *in vitro* mit Endothelzellen aus humanen Koronararterien (HCAECs) durchgeführt werden. Diese wurden ausgewählt, da die Erkenntnisse des Projekts zur Erforschung von therapeutischen Strategien zur Behandlung der myokardialen Ischämie beim Menschen dienen sollten und somit eine erste Übertragbarkeit der Erkenntnisse aus dem Tierversuch auf die menschliche Zelle untersucht werden sollte. Es wurden Koronarendothelzellen ausgewählt, da diese durch ihre Funktion als nutritive Gefäße am Herzen bei verstärkter Angiogeneseaktivität direkt zur schnelleren Wiederversorgung des Infarktareals mit Sauerstoff und Nährstoffen beitragen können. Die Zellen wurden von der Firma Lonza bezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in EBM-2-Basalmedium (BM) mit und ohne Zu-

sätze (Clonetics, Walkersville, MD-USA) in 6 cm Zellkulturschalen. Ein Teil der Zellen wurde in *growth medium* (GM) kultiviert. Dieses bestand aus BM mit 10 % fötalem Kälberserum (englisch: *fetal calf serum* = FCS). Es fanden ausschließlich Zellen der Passagen 2 - 9 Verwendung. Alle Arbeiten mit Zellen wurden an der sterilen Zellkultur-Arbeitsbank und mit sterilen Materialien und Lösungen durchgeführt.

4.2.17 Kombinierte RNA- und miRNA-Isolierung

Um die Regulation der Expression von Nampt und SIRT1 auf RNA-Ebene zu untersuchen, wurde eine quantitative Bestimmung der Gensequenzen mittels *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Durch die *in silico* Analyse von miRNA-Sequenzen sowie des Genoms von Maus und Mensch konnte unabhängig voneinander durch drei Suchmaschinen die miRNA-374 (Maus) bzw. sequenzhomolog die miRNA-374b (Mensch) als potentielle, Nampt-spezifische mRNA-bindende miRNA identifiziert werden. Daher sollte ebenfalls die Regulation der Expression von miRNA-374 untersucht werden. Hierfür fand zunächst die Isolierung von Gesamt-RNA und -miRNA aus den Gewebeproben bzw. HCAECs statt. Für die kombinierte RNA- und miRNA-Isolierung wurde das RNeasy Kit sowie QIA *shredder* Säulen und RNeasy MinElute *spin columns* von Qiagen verwendet.

Vorbereitung des Myokardgewebes:

Die myokardialen Gewebeproben (10 mg) wurden zunächst jeweils in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in 700 µl RLT-Lysepuffer des Kits mit einem Motorhandstück homogenisiert. Gewebereste wurden nachfolgend durch Zentrifugation (13.000 U/min) für zwei min bei RT abgetrennt, das Pellet verworfen und der Überstand zur weiteren Isolierung auf eine QIA *shredder* Säule pipettiert.

Vorbereitung der Zellen (HCAEC):

Zellen wurden in einer Anzahl von nicht mehr als 10^7 Zellen eingesetzt, da größere Mengen an Zellmaterial die mRNA / miRNA Isolation stört. Zunächst wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und 700 µl RLT-Lysepuffer auf die

Kulturschale gegeben. Das lysierte Zellmaterial wurde mit einem Zellschaber abgelöst und auf eine QIA *shredder* Säule überführt.

Die folgenden Arbeitsschritte waren für Gewebe- und Zellproben identisch:

Die mit Probenmaterial beladenen QIA *shredder* Säulen wurden für zwei min bei 13.000 U/min und RT zentrifugiert und danach für fünf min bei RT inkubiert. Als nächstes wurde 140 µl Chloroform zum resultierenden Eluat gegeben und bei RT für drei min inkubiert. Durch die nachfolgende Zentrifugation für 15 min bei 13.000 U/min und 4 °C ergab sich eine Schichtung der Probe, wobei lediglich die oberste Schicht RNA enthielt, nicht jedoch die weiße Interphase bzw. die rote unterste Schicht. Die obere Schicht wird nun in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und mit 300 µl 70 % Ethanol vermischt. Der gesamte Inhalt des Reaktionsgefäßes wurde nun auf die RNeasy *spin column* des Kits pipettiert und für 15 sec bei 10.000 U/min und RT zentrifugiert. Das Eluat enthielt nun die miRNA-haltige Fraktion und wurde mittels des RNeasy MinElute *cleanup* Kits der Firma Qiagen weiter aufgeschlossen. Die Säule enthielt die RNA und wurde mit dem RNeasy *mini* Kit der Firma Qiagen weiter aufgeschlossen.

RNA-Isolierung:

Es folgte ein DNase-Verdau. Hierzu wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Säule pipettiert, diese für 15 sec bei 10.000 U/min und RT zentrifugiert und das Eluat verworfen. Nun wurden 10 µl der DNase I *stock solution* mit 70 µl des sogenannten RDD-Puffers des Kits auf die Säule gegeben und diese für 15 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben, diese für 15 sec bei 10.000 U/min und RT zentrifugiert; das Eluat wurde erneut verworfen. Es wurden nun 500 µl RPE-Puffer des Kits auf die Säule pipettiert, diese für 15 sec bei 10.000 U/min und RT zentrifugiert und das Eluat erneut verworfen. Die Säule wurde nun in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und für 60 sec bei 13.000 U/min und RT zentrifugiert. Die Säule wurde erneut in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 30 µl RNase-freiem Wasser beladen. Die finale Zentrifugation bei 10.000 U/min und RT für 60 sec ergab ein Eluat, welches die isolierte RNA der Probe enthielt.

miRNA-Isolierung:

Zu dem Eluat der RNeasy *spin column* (siehe oben) wurden 450 µl absoluten Ethanols zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden kurz geschüttelt, der Inhalt auf eine RNeasy MiElute *spin column* des Kits pipettiert und diese für 15 sec bei 10.000 U/min und RT zentrifugiert; das Eluat wurde verworfen. Der letzte Schritt wurde mit derselben Säule so oft wiederholt, bis die komplette Probe verbraucht war, wobei das Eluat jeweils verworfen wurde. Es wurden nun 500 µl RPE-Puffer auf die Säule pipettiert und diese mit 10.000 U/min bei RT für 15 sec zentrifugiert. Nach Verwerfung des Eluats wurden 500 µl 80 % Ethanol auf die Säule gegeben und diese mit 10.000 U/min für zwei min bei RT zentrifugiert. Die Säule wurde daraufhin in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, bei 10.000 U/min und RT für fünf min zentrifugiert und wiederum in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die finale Elution der miRNAs erfolgte durch Zugabe von 14 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugation bei 10.000 U/min und RT für 60 sec; das Eluat enthielt die isolierte miRNA.

Die Konzentration der eluierten RNA- bzw. miRNA-Lösungen wurde mittels Nanodrop (ND-1000 Spectrometer, Peqlab) durch alternierende Messung der Absorption bei 260 bzw. 280 nm bestimmt. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.18 *Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion*

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt eine wichtige molekularbiologische Methode zur exponentiellen Vervielfältigung von bestimmten, kurzen Abschnitten der DNA *in vitro* dar. Dies dient der Untersuchung der Expression eines bestimmten DNA-Abschnitts (z.B. eines Gens). Bei der quantitativen *real-time* PCR ist zusätzlich durch eine Fluoreszenzmessung (FRET-Analyse), die während der gesamten Reaktion stattfindet, eine Quantifizierung der entstehenden Produkte möglich, da hier die Fluoreszenz proportional mit den entstehenden Produkten zunimmt. Komponenten der PCR sind zum einen die zu untersuchende Probe, zum anderen zwei Primer, die spezifisch den Startpunkt des DNA-Abschnitts auf beiden Strängen der DNA begrenzen, das Enzym Polymerase, welches die Vervielfältigung durchführt und schließlich Desoxyribonukleintriphosphat-Komponenten für die Produkte des Replikations-

vorgangs. Es werden 20 - 50 sich wiederholende Zyklen derselben Abfolge an Schritten durchgeführt. Zunächst erfolgt der Denaturierungsschritt. Bei diesem werden die Wasserstoffbrückenbindungen der Doppelstränge der DNA aufgebrochen, sodass Einzelstränge vorliegen. Dieser findet bei 94 - 96°C statt. In dieser Phase erfolgt auch die (Hitze-)Aktivierung der Polymerase. Der nächste Schritt ist die Phase der Primerbindung. Die Temperatur hängt hier von der Temperatur ab, bei welcher der jeweilige Primer sich am besten an die DNA anlagern kann. Bei zu niedrigen Temperaturen kommt es auch an nicht vollständig zu den Primern komplementären DNA-Abschnitten zur Anlagerung und es entstehen ungewollte Banden bei der Auswertung. Bei zu hohen Temperaturen kann sich der Primer nicht richtig anlagern und die Produktbildung ist nur sehr ineffizient möglich. Die Idealtemperatur liegt meist 5 - 10°C unter dem Schmelzpunkt des Primers, bei etwa 55 - 65°C. Der dritte Schritt ist dann der Elongationsschritt. Es erfolgt die Produktion des komplementären Strangs mit Start am Primerlocus. Die angewandte Temperatur hängt von der Idealtemperatur der verwendeten Polymerase ab. Diese liegt meist zwischen 68 und 72°C^{73,74}.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Expression von Nampt, SIRT1 und miRNA-374 im Herzen nach Myokardinfarkt bzw. in HCAEC nach Behandlung mit verschiedenen Faktoren (siehe Kap. 4.2.21, 4.2.25, 4.2.26) untersucht werden.

4.2.19 Reverse Transkription: RNA

Um die Transkription eines Genes nachzuweisen, wird dessen Expressionrate auf RNA-Ebene detektiert. Hierfür wird zunächst die aus Gewebeproben bzw. Zellkulturen isolierte Gesamt-RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT) in die Intron-freie, zunächst einzelsträngige "*complementary*" DNA (cDNA) umgeschrieben und diese später in der quantitativen *real-time* PCR amplifiziert und detektiert.

Hierfür fand ein Mastermix mit folgenden Komponenten Verwendung:

5 x RT Buffer	4 μ l
DTT (100 mM)	2,5 μ l
RNase-Inhibitor (30 U/l)	0,5 μ l
Random Primer (50 A ₆₀ Units)	1,5 μ l
dNTPs (10 nM)	1 μ l
RT (200 U/l)	1 μ l

Diesem Mastermix (10,5 μ l) wurden 9,5 μ l an isolierter RNA (ca. 300 ng) zugegeben. Die Mischung wurde für 60 min bei 37°C und danach für 15 min bei 99°C inkubiert. Die entstandene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Reverse Transkription: miRNA

Für die reverse Transkription von miRNAs wurde das miScript *reverse transcription* Kit der Firma Qiagen verwendet. Es wurden pro Reaktion 4 μ l miScript RT Buffer (5 x), 1 μ l miScript RT Mix und eine einheitliche Konzentration an miRNA (50 ng) in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Die Reaktion wurde für 60 min bei 37°C, gefolgt von 5 min bei 95°C inkubiert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Quantitative *real-time* PCR

Für die Quantifizierung der entsprechenden Produkte der quantitativen *real-time* PCR wurden die jeweiligen "*cycle threshold*" (ct)-Werte verwendet. Der ct-Wert beschreibt den Schwellenwertzyklus der Elongationsphase, bei dem die Fluoreszenz des Produktes erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Dies ist in der Mitte der Elongationsphase der Fall. In der Anfangsphase der Elongation kommt es noch nicht zu einer idealen Zusammenfindung von DNA, Primer und Polymerase. Am Ende der Elongationsphase ist dann die Menge der Produkte bereits so groß, dass es teilweise zur Hybridisierung von Produktfragmenten sowie zur Hitzedenaturierung von Polymerase und Nukleotiden kommt.

Die Berechnung der relativen Regulation des Gens erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode mit Hilfe der internen Kontrolle mittels der Formel:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = 2^{\Delta\text{Ct (Kontrolle)} - \Delta\text{Ct (treatment)}}$$

wobei $\Delta\text{Ct} = \text{Ct (Gen)} - \text{Ct (Referenzgen)}$. Es wurde so die Genexpression des Zielgens gegenüber einem internen Standardgen normalisiert⁷⁵. Dabei wurde für die RNA-spezifische PCR das Gen für GAPDH, für die miRNA-spezifische PCR das Gen für U6 (humane Proben) bzw. sno-135 (murine Proben) als “*house-keeping*“ Standardgen verwendet.

Real-time PCR: RNA

Die PCR wurde mit dem Gerät MxPro3000P der Firma Stratagen und dem Kit SensiMix der Firma Peqlab durchgeführt.

Je Reaktion wurde folgender Mastermix hergestellt:

PCR-Mix	10 μl
SYBR Green	0,4 μl
cDNA	1,0 μl (300 ng)
Forward Primer	0,6 μl
Reverse Primer	0,6 μl
H ₂ O	7,4 μl

Folgendes Programm wurde verwendet:

8 min 30 sec bei 95°C zur Aktivierung der Polymerase

40 Zyklen:

30 sec. 95°C

30 sec. 50 - 55°C (je nach Primer siehe Tab. 3)

30 sec. 72°C

+ Schmelzkurve

Tabelle 3: Primer für real-time PCR (for = forward; rev = reverse)

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als "house-keeping" Gen verwendet, Sir2 entspricht dem humanen SIRT1 in der Maus, hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 α)

Primer	Sequenz (5' - 3')	Schmelztemperatur PCR
GAPDH (human, murin), for	TGCACCACCAACTGCTTAGC	50°C
GAPDH (human, murin), rev	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	50°C
Sir2 (murin), for	CTGTTGACCGATGGACTGCT	50°C
Sir2 (murin), rev	ATCGGTGCCAATCATGAGAT	50°C
Nampt (murin), for	AGCAGCAGAGCACAGTACCA	50°C
Nampt (murin), rev	TGACCACAGACACAGGCACT	50°C
SIRT1 (human), for	GCGATTGGGTACCGAGATAA	55°C
SIRT1 (human), rev	GTTGGAGGATCTGTGCCAAT	55°C
Nampt (human), for	TCCCAAGAGACTGCTGGCATAGGA	55°C
Nampt (human), rev	GCTGCTGGAACAGAATAGCCTGGA	55°C
HIF1 α (human), for	CTCAAAGTCGGACAGCCTCA	55°C
HIF1 α (human), rev	CCCTGCAGTAGGTTTCTGCT	55°C

Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen.

Real-time PCR: miRNA

Die Messungen erfolgten mit dem MxPro3000P von Stratagen; die PCR wurde mit dem Kit miScript SYBR *green* PCR Kit (Qiagen) durchgeführt.

Je Reaktion wurde folgender Mastermix hergestellt:

2 x QuantiTect <i>master-mix</i>	10 μ l
10 x miScript <i>universal primer</i>	0,4 μ l
cDNA	1 μ l (50 ng)
Spezifischer Primer	1 μ l
H ₂ O	6 μ l

Folgendes Programm wurde verwendet:

15 min 95°C zur Aktivierung der Polymerase

40 Zyklen:

15 sec. 94°C

30 sec. 50-55°C (je nach Primer)

30 sec. 70°C

+ Schmelzkurve

Tabelle 4: miRNA-Primer für real-time PCR

U6 non-coding small nuclear RNA (U6 snRNA) wurde als "house-keeping" Gen bei humanen Proben verwendet, small nucleolar RNA-135 (sno-135) wurde als house-keeping Gen bei murinen Proben verwendet

Primer	Sequenz (5´ - 3´)	Schmelztemperatur PCR
mmu-miRNA-374 (murin)	ATATAATACAACCTGCTAAGTG	50°C
hsa-miRNA-374b (human)	ATATAATACAACCTGCTAAGTG	50°C
U6 (human)	AAATTCGTGAAGCGTTCCAT	50°C
Sno-135 (murin)	TGGTGAGCCTATGGTTTTCTG	50°C

Die spezifischen miRNA-Primer-Sequenzen entsprechen den maturen miRNA-Sequenzen, veröffentlicht bei: <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/> und wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen.

4.2.20 SIRT1 activity Assay

SIRT1 beeinflusst über Protein-Deacetylierung die Funktion verschiedener Zielproteine und ist dadurch an diversen physiologischen und pathologischen Abläufen beteiligt. Es sollte daher nicht nur dessen mRNA-Expression, sondern auch seine enzymatische Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt untersucht werden.

Die Aktivität von SIRT1 in Gewebelysaten des Infarktareals wurde mit dem Amplite™ fluorometric HDAC activity Assay Kit der Firma ABD Bioquest Inc. nach dem angegebenen Protokoll bestimmt. Zunächst erfolgte eine Proteinisolierung aus den myokardialen Gewebesproben (siehe Kap. 4.2.6). Es wurden jeweils 40 µl mit 5 mg/ml Protein in component B Puffer des Kits in eine 96-

Well-Mikrotiterplatte im Doppelansatz pipettiert. Als Positivkontrolle dienten 40 µl der HDAC "*enzyme solution*" des Kits. Als Negativkontrolle wurde weitere 40 µl der Proteinprobenlösung mit 10 µl Trichostatin A gemischt. Trichostatin A blockiert selektiv die Klasse 1 und Klasse 2 Histon-Deacetylasen, nicht jedoch diejenigen der Klasse 3, zu welcher die Sirtuine gehören. Für eine Leerkontrolle wurde lediglich 40 µl Assay-Puffer (*component B*) in das entsprechende Well pipettiert. Die Platte wurde dann für 10 - 20 min bei RT inkubiert. Als Nächstes wurden zu jedem Well 50 µl HDAC GreenTM *substrate working solution* gegeben. Es folgte erneut eine Inkubation für 30 - 60 min bei RT. Die Intensität der Fluoreszenz konnte nun bei Anregung/Emission (excitation / emission (Ex/Em)) = 490 / 525 nm gemessen werden. Für die Auswertung wurde zunächst die Hintergrundfluoreszenz des Puffers von allen gemessenen Werten subtrahiert.

4.2.21 Reverse Transfektion mit miRNA-Inhibitoren (anti-mi-RNAs) bzw. miRNA-Precursor-Molekülen (pre-miRNAs)

MiRNA-Inhibitoren (anti-miRNAs) sind chemisch modifizierte, komplementäre RNA-Moleküle, die die entsprechende miRNA binden und dadurch in ihrer Funktion hemmen. Um andererseits eine *down*-regulierte miRNA in ihrer Konzentration wieder zu erhöhen, kann die zu untersuchende miRNA durch das Einbringen einer doppelsträngigen Precursor-Form in die Zielzelle überexprimiert werden. Beide Moleküle wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Transfektion in die Zielzelle (HCAECs) integriert, um die Auswirkung einer Hemmung der miRNA-374 bzw. deren Überexpression nach verschiedenen Einflüssen auf die Zellen näher zu untersuchen. Als Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Dies wurde mit Hilfe einer Lipofektion durchgeführt. Hierbei werden die Nukleinsäuren in Liposomen eingeschlossen und über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Bei der reversen Transfektion findet das Aussähen der Zellen zur gleichen Zeit statt wie die Transfektion. Dies erhöht die Transfektionseffizienz, da die freischwimmenden Zellen eine größere Oberfläche für die Transfektion bieten als adhärenente Zellen. Zu Beginn wurden die HCAECs mit Hilfe von Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) von der Zellkulturschale gelöst, in BM

resuspendiert und gezählt. Für eine Transfektion in 6-cm Schalen wurden 250.000 Zellen in 2,5 ml BM verwendet.

Für einen Transfektionsansatz wurden zunächst 250 µl Opti-MEM mit 2,5 µl Lipofectamin vermischt und für 15 min bei RT inkubiert. Als Nächstes wurden 100 nM anti-miRNA bzw. 20 nM Pre-miRNA mit 237,4 µl Opti-MEM verdünnt und zum ersten Ansatz gegeben. Es folgte erneut ein Inkubationsschritt von 15 min bei RT. Nachfolgend wurden 500 µl des vollständigen Transfektionsansatzes in 6 cm Zellkulturschalen vorgelegt, und jeweils 2,5 ml an Zellsuspension (250.000 Zellen) zugegeben. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37°C. Nach 24 h wurde das Medium zu GM gewechselt. Bei anti-miRNA-Transfektion erfolgte nach 48 h, bei pre-miRNA-Transfektion nach 72 h Stunden eine miRNA bzw. Proteinisolierung (siehe Kap. 4.2.17 und 4.2.6).

4.2.22 Endothelzell-Stimulation mit verschiedenen Faktoren

Die HCAECs wurden mit verschiedenen Stimuli behandelt, um zu testen, welcher dieser Faktoren die Regulation von Nampt bzw. miRNA-374 einerseits und nachfolgend auch das Proliferations-, Migrations- und Angiogenesepotential der Zellen andererseits am meisten zu beeinflussen vermag. Es wurden Faktoren gewählt, welche die dominierenden Einflussfaktoren widerspiegeln, der die Zellen nach einem Myokardinfarkt ausgesetzt sind. Es handelte sich dabei folgerichtig um Wachstumsfaktoren, Entzündungsmediatoren, einen Apoptose-Stimulus sowie Hypoxie. Es wurden pro Kondition jeweils drei Wells mit je 100.000 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät (drei Wells mit Zellen und BM dienten jeweils als Kontrolle). Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel zu BM durchgeführt und nach weiteren 24 h wurden die Zellen wie folgt stimuliert:

1. Stimulation mit Wachstumsfaktoren (GM, enthält 10 % FCS)
2. Stimulation mit einem Cocktail aus humanen inflammatorischen Zytokinen:
 - Tumornekrosefaktor (TNF)-α 20ng/ml in BM
 - Interferon (INF)-γ 20 ng/ml in BM
 - Interleukin (IL)-1β 20 ng/ml in BM
3. Stimulation mit Apoptose-Induktor H₂O₂ 0,5 mM in BM

4. Stimulation mit Hypoxie (24 h Inkubation in der Hypoxie-Kammer, mit 1 % Sauerstoff (O_2), siehe Kap. 4.2.22.1)

Die Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation, bezogen auf den Start der Stimulationsphase, „geerntet“, und nachfolgend eine Isolierung von Protein, RNA und / oder miRNA durchgeführt (siehe Kap. 4.2.6. und 4.2.17).



Abbildung 15: Hypoxiekammer

(<http://www.brincubator.com/hypoxiachamber.htm>)

Die Hypoxiekammer bestand aus einem Bodenteil mit zwei abgehenden Schläuchen zur Ein- und Ausleitung von Gas, mehreren einsetzbaren Ebenen zur Platzierung von Zellkulturschalen sowie einem Deckelteil. Eine den Boden- und Deckelteil verbindende Manschette wurde außen herum geschnallt.

Hypoxiebehandlung

Für die Hypoxiebehandlung wurden Zellkulturgefäße mit den enthaltenen Zellen und Medium je nach Versuch in Hypoxiekammern der Firma Billups-Rothenberg inkubiert. Hierfür wurden zunächst die Zellkulturmaterialien (Behältnisse, Medien) in der Kammer mit der entsprechenden Gasmischung für zwei h vorinkubiert (Abb. 15). Die Luftfeuchtigkeit in der Kammer wurde durch das Platzieren einer mit sterilem Wasser gefüllten Petrischale auf den Boden der Kammer gewährleistet. Die einströmende Gasmenge wurde durch ein *flow-meter*, welches zwischen Gasflasche und Einströmungsschlauch der Kammer angebracht wurde, auf einen Flussstärke von 20 - 25 l/min geregelt. Die verwendete Gasmischung enthielt 1 % O_2 (5 % CO_2 , 94 % N_2). Sowohl der Ein-

strömungs- als auch der Ausströmungsschlauch wurde nach Begasung jeweils luftdicht verschlossen. Die Kammer war somit hermetisch von der Außenwelt abgeschlossen. Die Kammer wurde dann in den Zellkultur-Brutschrank verbracht. Die Gasmischung wurde 3 x pro Tag durch ein vierminütiges Fluten der Kammer erneuert. Es konnte gezeigt werden, dass bei diesem Protokoll konstant die gewünschte Gaskonzentration in der Kammer erhalten werden konnte⁷⁶. Die Zellen wurden in BM für 24 h, 48 h und 72 h der Hypoxie ausgesetzt. Hiernach folgten Protein-, RNA- und miRNA-Isolierung (siehe Kap. 4.2.6. und 4.2.17).

4.2.23 Proliferationsassay

Nachdem HCAECs verschiedenen Stimuli bzw. beeinflussenden Faktoren ausgesetzt wurden, wurde mit Hilfe eines BrdU ELISA Kits der Firma Roche ihr Proliferationsverhalten bestimmt. Bei diesem Assay kommt es zu einem kompetitiven Einbau des Thymidin-Analogons 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU) in die DNA. Hauptsächlich erfolgt dieser Einbau während der DNA-Neusynthese in der S-Phase des Zellzyklus proliferierender Zellen. Es lässt sich somit durch Messung der Menge an eingebautem BrdU auf die Proliferationsaktivität der Zellen schließen. Für die Versuche wurde 2.500 HCAECs je Well in 96-Well-Mikrotiter-Platten ausgesät und den Versuchsbedingungen entsprechend vorbehandelt (siehe Kap. 4.2.21 und 4.2.22). Nach 48 h fand ein Mediumwechsel zu GM statt, und nach weiteren 48 h erfolgte die Proliferationsmessung. Hierfür wurden zu jedem Well 100 µl Wachstumsmedium sowie 10 µl *BrdU-labeling solution* (5-Bromo-2'-Desoxyuridin in phosphatgepufferter Salzlösung, englisch: *phosphate buffered saline* (PBS)) gegeben. Die 10 mM Lösung wurde hierfür zunächst mittels BM auf eine Konzentration von 100 µM gebracht. Nach einer Inkubation von 24 h im Brutschrank wurde zusätzlich 10 µl WST-1 zugegeben. WST-1 (*water soluble tetrazolium*) wird zum Nachweis einer intakten Atmungskette in Zellen als Zeichen ihrer Viabilität verwendet. Lebende Zellen mit einem intakten mitochondrialen Succinat-Tetrazolium Dehydrogenase-System bewirken eine enzymatische Umsetzung des rot gefärbten Tetrazoliumsalzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) in das dunkelrote Formazan. Dieser Farbumschlag kann im ELISA-Plattenleser

quantitativ erfasst werden. Für die eigentliche Proliferationsmessung wurde das Medium der Mikrotiter-Platte nach sechs h entfernt, 200 µl Fixierlösung des Kits zugegeben und die Zellen für 30 min inkubiert. Hierdurch wurde die DNA denaturiert, um das inkorporierte BrdU für einen Antikörper zugänglich zu machen. Nach dem Entfernen der Fixierlösung wurden 100 µl pro Well anti-BrdU Lösung in jedes Well gegeben. Diese enthielt einen murinen monoklonalen, an Peroxidase (POD) gekoppelten Primärantikörper gegen BrdU (der kommerzielle Antikörper musste zunächst in 1,1 ml destilliertem Wasser gelöst und 1:100 in einer mitgelieferten Antikörper *dilution solution* verdünnt werden). Nach 90-minütiger Inkubation wurden die Wells 3 x mit jeweils 200 µl Waschpuffer gewaschen. Die gebildeten Immunkomplexe wurden mit Hilfe einer Substratlösung für POD (Tetramethyl-Benzidin) sichtbar gemacht. Hierfür wurden 100 µl der Substratlösung pro Well für 20 - 30 min auf die Zellen gegeben. BrdU-haltige Zellen wiesen eine Blaufärbung auf. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 25 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt, wodurch es zu einem Farbumschlag von blau nach gelb kam, welcher mit Hilfe des ELISA-Plattenlesers bei 450 nm gemessen und anschließend quantifiziert werden konnte.

4.2.24 Migrationsassay

Das Migrationsverhalten von HCAECs nach Behandlung mit den verschiedenen Faktoren wurde mit Hilfe von 24-Well-Transwellplatten der Firma Corning Incorporated untersucht. Die Einsätze der Platten bestehen an ihrer Unterseite aus einer Polycarbonatmembran mit unregelmäßig angeordneten, acht µm großen Poren, die eine Migration der Zellen ermöglichen. Zur besseren Adhäsion der durchgewanderten Zellen an der Unterseite der Membran wurde diese mit 1,5 % Gelatine beschichtet. Zur Herstellung von 100 ml der 1,5 % Gelatine wurden 1,5 g Gelatinepulver in 100 ml *Aqua dest.* gelöst und die Lösung autoklaviert. Es wurden 500 µl Gelatine pro Well vorgelegt, die Einsätze wurden eingehängt und mit weiteren 100 µl Gelatine befüllt. Es folgte eine Inkubation in Gelatine für zwei h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Einsätze in mit 500 µl PBS gefüllte Wells gehängt und schließlich in leere Well zum Trocknen für 30 min eingehängt. Für den Versuch wurden die Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät und entsprechend vorbehandelt (siehe Kap. 4.2.21 und 4.2.22). Nach 24 h fand

ein Mediumwechsel zu GM statt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen trypsinisiert und jeweils 50.000 Zellen in 150 µl GM pro Well in die obere Kammer der Einsätze pipettiert. Die untere Kammer der Transwell-Platten wurde mit 600 µl Medium gefüllt. Als Migrationsreiz enthielt dieses Medium 10 % FCS sowie 50 ng/ml VEGF. Die Platte wurde für sechs h im Brutschrank inkubiert. Die nicht migrierten Zellen wurden von der Oberfläche der Transwell-Einsätze mit einem Baumwolltupfer abgelöst, die Transwell-Einsätze in eine neue Platte gesetzt, worin 300 µl Medium mit 30 µl WST-1 (1:10) vorgelegt wurden. Durch die Metabolisierung des WST-1 durch die migrierten Zellen kam es zu einem messbaren Farbumschlag von rot nach gelb. Der Grad des Farbumschlags erwies sich als proportional zur Anzahl an migrierten Zellen. Für die Messung des Farbumschlags wurden 100 µl des Mediums in eine 96-Well Mikrotiterplatte überführt und mittels ELISA-Plattenleser bei 450 nm gemessen.

4.2.25 *Tube formation Assay*

Die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen von Endothelzellen im *tube formation* Assay diente der Analyse des Angiogenesepotentials von Endothelzellen. Für die Versuche wurden 250.000 HCAECs in 6-cm-Zellkulturschalen ausgesät und entsprechend der Versuchsbedingungen behandelt (siehe Kap. 4.2.21 und 4.2.22). Pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 50 µl Matrigel vorgelegt, welches nach Überführung der Mikrotiterplatte in den Brutschrank bei 37°C fest wurde. Die HCAECs wurden 24 h nach Aussäen trypsinisiert und nach dem Zentrifugieren in 1,0 ml GM resuspendiert. In jedes Well wurden 100 µl der Zellsuspension pipettiert. Pro Versuchskondition wurde ein Doppelansatz pipettiert. Nach 24 h wurde die Platte mit 200 µl 2 % PFA (Paraformaldehyd, Roti Histofix 4 %) pro Well fixiert. Die Mikrotiterplatte konnte bei 4°C bis zur Auswertung gelagert werden. Die kumulative Länge der kapillären Sprosse im gebildeten Netzwerk wurde mit Hilfe des digitalen Bildverarbeitungsprogramms MetaMorph® (Microscopy Automation & Image Analysis Software 7.1.3.0, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) bestimmt. Hierzu wurden alle sichtbaren Strukturen ausgewertet (Abb. 16).

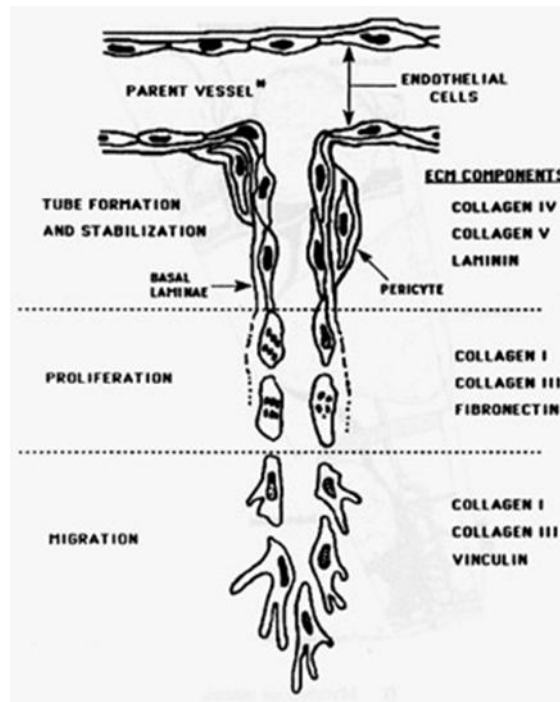


Abbildung 16: Übersicht tube formation (aus: Stewart et al.; Hum Reprod Update.; 1996)

Ein Kapillarspross entsteht aus einem bestehenden Gefäß in mehreren Schritten. Der erste Schritt besteht aus der Degradation der Basalmembran (nicht dargestellt). Im nächsten Schritt kommt es zur Migration der Zellen in Richtung eines angiogenetischen Stimulus. Die Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM), Kollagen IV, V und Laminin sind assoziiert mit der Basalmembran. Durch die Degradation der Basalmembran erhalten sie Kontakt zu interstitiellem Kollagen I und III sowie Fibronectin. Dies fördert die Migration der Endothelzellen. Nach 24 h fangen die migrierten Zellen an zu proliferieren und bilden so einen Kapillarspross aus. Im letzten Schritt formt sich innerhalb dieses Sprosses ein Lumen⁷⁷.

4.2.26 Transfektion von Endothelzellen mit Namp1 siRNA

Synthetisch hergestellte *small interfering RNAs* (siRNAs) werden in der Forschung eingesetzt, um durch RNA Interferenz die Expression spezifischer Zielgene zu verringern. Sie werden in doppelsträngiger, verlängerter Form in die Zellen transfiziert und dort in den RISC-Komplex eingebunden. Dort wird die siRNA in ihre aktive, einzelsträngige Form gespalten und der gesamte Komplex inklusive aktiver siRNA bindet an die Ziel-mRNA und führt zu deren Degradation - ähnliche Vorgänge wie bei miRNAs (Abb. 17). Die resultierende Verminderung des entsprechenden Genproduktes ermöglicht es, dies mittels PCR genauer zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Effekte ein *knock-down* von Namp1 auf das Proliferations-, Migrations- und Angiogenesepotential von Endothelzellen hat. Die Transfektion mit Namp1-spezifischer siRNA läuft ähnlich der mit Anti-miRNAs bzw. Pre-miRNAs (siehe

Kap. 4.2.21) ab. Als Kontrolle wurde eine Transfektion mit einer Kontroll-siRNA durchgeführt, die nachweislich keine mRNA bindet. Zu Beginn wurden die Zellen (HCAECs) trypsinisiert, in BM resuspendiert und gezählt. Für eine Transfektion in 6-Well-Platten wurden 250.000 Zellen in 2,5 ml BM verwendet. Für einen Transfektionsansatz wurden 1530 μ l Opti-MEM mit 15,3 μ l Lipofectamin und 46 μ l siRNA bzw. siRNA-Kontrolle (2 μ M) vermischt und für 15 min inkubiert. 500 μ l des vollständigen Transfektionsansatzes wurden nachfolgend in eine 6-Well-Platte vorgelegt, dazu wurden 2,5 ml der Zellsuspension mit den darin enthaltenen 250.000 Zellen pipettiert. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37°C und atmosphärischer Sauerstoffkonzentration. Nach 24 h wurde das Medium zu GM gewechselt. Nach 48 h erfolgte die RNA-Isolierung mit nachfolgender cDNA-Synthese und Durchführung von PCR bzw. Proliferations-, Migrations und tube formation Assay (siehe Kap. 4.2.17, 4.2.23-25).

Tabelle 5: Sequenzen der Nampt-spezifischen und der Kontroll- siRNAs

siRNA	Sequenz (5' - 3')/Produkt
Nampt	CCACCGACUCCUACAAGGUUA
Unspezifische Kontrolle	AGGUAGUGUAAUCGCCUUG

Die siRNAs wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen.

4.2.27 *In silico* Methode zur miRNA Zielgenvorhersage

Die miRNA-Zielgenvorhersage wurde mit Hilfe der miRWalk-Database der Universität Heidelberg (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/predictedmirnagene.php>) durchgeführt. Auf dieser Seite werden die Ergebnisse von acht etablierten miRNA *target* Berechnungsprogrammen zur Verfügung gestellt, die jeweils mit unterschiedlichen Algorithmen arbeiten. Sie dienen jeweils der Suche einer potentiellen Bindung einer mRNA an verschiedene miRNAs einerseits und von einer speziellen miRNA an potentielle *target* mRNAs andererseits. Hierbei wird die mature miRNA-Sequenz einer miRNA mit allen bekannten Genen des Menschen, der Maus und der Ratte verglichen.

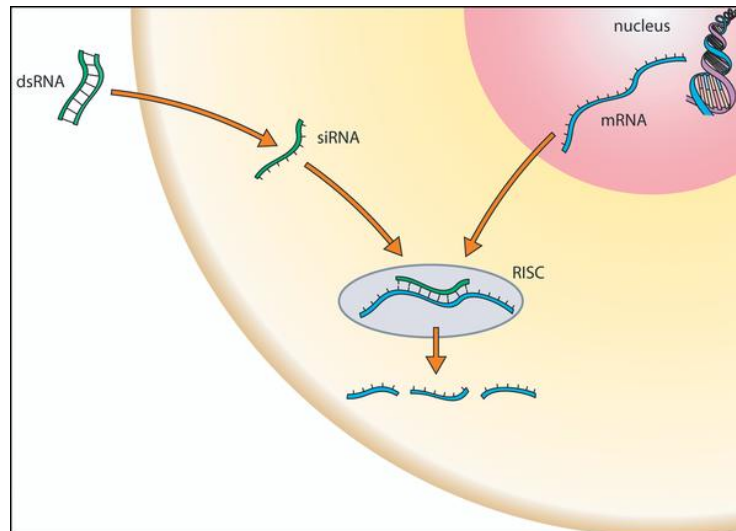


Abbildung 17: Schema der zellulären Transfektion mit siRNA (http://de.wikipedia.org/wiki/Small_interfering_RNA)

SiRNAs werden in doppelsträngiger, verlängerter Form (dsRNA) in die Zellen transfiziert und dort in den RNA induced silencing complex (RISC) Komplex eingebunden. Dort wird die siRNA in ihre einzelsträngige, aktive Form gespalten (siRNA). Der gesamte Komplex inklusive aktiver siRNA bindet an die Ziel-mRNA im Zellkern und führt zu deren Degradation.

4.2.28 Luciferase Assay

Der Luciferase Assay ist ein Reporter-gen-Assay zur Validierung der Bindung einer spezifischen miRNA an die 3'UTR ihrer potentiellen *target* RNA. In der vorliegenden Arbeit sollte die *in silico* prognostizierte Bindung von miRNA-374 an das potentielle "*target*" Nampt verifiziert werden (Abb. 18). Hierfür wurde ein Vektor hergestellt, in welchen neben dem Luciferase-Gen die 3'UTR-Sequenz des Zielgens Nampt eingebracht wurde. Kommt es zur Bindung der miRNA, so wird das Ablesen des Luciferase-Gens verhindert, was eine verringerte Lumineszenz bei der Messung zur Folge hätte. Als Kontrolle diente ein *random* 3'UTR Kontroll-Vektor, der sogenannte "*nonsense*" Genomfragmente enthielt. Nampt- sowie Kontrollvektor wurden von der Firma SwitchGear Genomics bezogen.

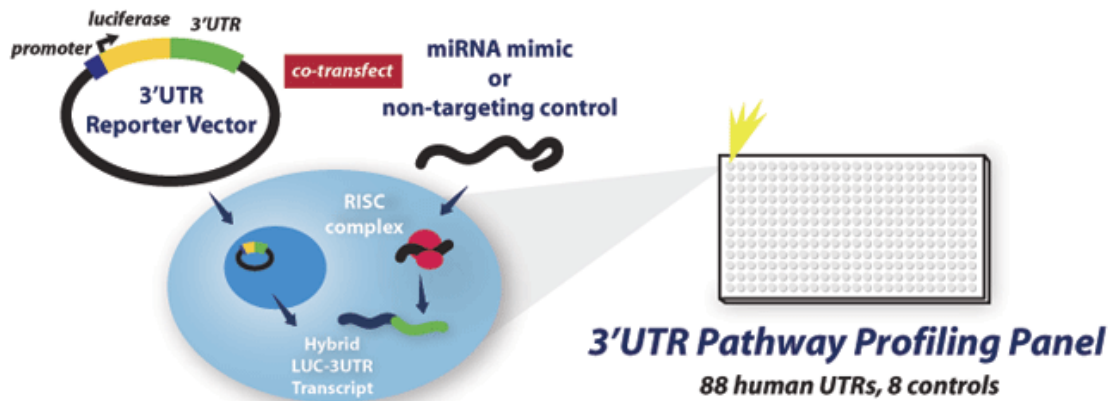


Abbildung 18: Schema des Luciferase Assays (<http://switchgeargenomics.com/products/goclone-validated-mirna-targets/applications/>)

Eine Zielzelle wird mit einem Vektor, in welchen neben dem Luciferase-Gen die 3'UTR-Sequenz des Zielgens eingebracht wird, transfiziert. Kommt es zu einer Bindung der miRNA an deren komplementärer Ziel-3' untranslated region (UTR) wird das Ablesen des Luciferase-Gens verhindert und es kommt zu weniger Lumineszenz bei der Messung. Als Kontrolle dient ein Random 3'UTR Kontroll-Vektor, dieser enthält nonsense Genomfragmente, die keine komplementäre Bindung der zu untersuchenden miRNA erlauben. Durch die fehlende Inhibition der Transkription des Luciferasegens kommt es in der Kontrolle zu einer verstärkten Lumineszenz.

Reverse Transfektion von HEK-Zellen

Für den Luciferase Assay wurden zunächst *human embryonic kidney* (HEK)-Zellen mit der pre-miRNA-374, einer Negativ-Kontrolle der miRNA sowie dem Nampt-Plasmid bzw. dem Kontroll-Plasmid transfiziert. Hierfür wurden zunächst für jeden Ansatz vier µl Lipofectamin mit 108 µl Opti-MEM für 15 min inkubiert, sowie jeweils 1,05 µl der 20 µM Pre-miRNA-374b bzw. der Kontroll-pre-miRNA mit 100,8 µl Opti-MEM vermischt. Die Pre-miRNA-374 bzw. Kontroll-pre-miRNA-Proben wurden nun auf jeweils 2 x 50,4 µl aufgeteilt und mit 400 ng Nampt-Plasmid bzw. Kontroll-Plasmid in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zugabe von 56 µl des vorinkubierten Lipofectamin-Ansatzes zu den Proben erfolgte eine weitere Inkubation von 15 min. Es wurden nun pro Probe jeweils 26,6 µl in 4 Wells einer 96-Well-Platte pipettiert und mit 105 µl HEK-Zellen vermischt (Gesamtzellzahl: 1×10^6 in Transfektionsmedium) (siehe Pipettierschema Abb. 19).

Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay wurde nach dem Protokoll des LightSwitch Luciferase Assay Systems der Firma SwitchGear Genomics durchgeführt. Zunächst wurde das lyophilisierte Luciferase-Substrat mit 100 µl des mitgelieferten Substrat-Lösungsmittels gelöst. Nachfolgend wurden 100 µl des Substrates in 10 ml Assay-Puffer zur gebrauchsfertigen Assay-Lösung verdünnt und in einem 37°C warmen Wasserbad aufgewärmt. Es wurden jeweils 100 µl der Assay-Lösung in Wells einer opaquen 96-Well-Platte zu jeweils 100 µl HEK-Zellen aus der Transfektion (siehe Kap 4.2.27.1 und Abb. 20) pipptiert. Die Platte wurde zum Schutz vor Lichteinfall mit Aluminiumfolie abgedeckt. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Die Lumineszenz der Wells der Platte wurde nachfolgend in einem Luminometer gemessen.

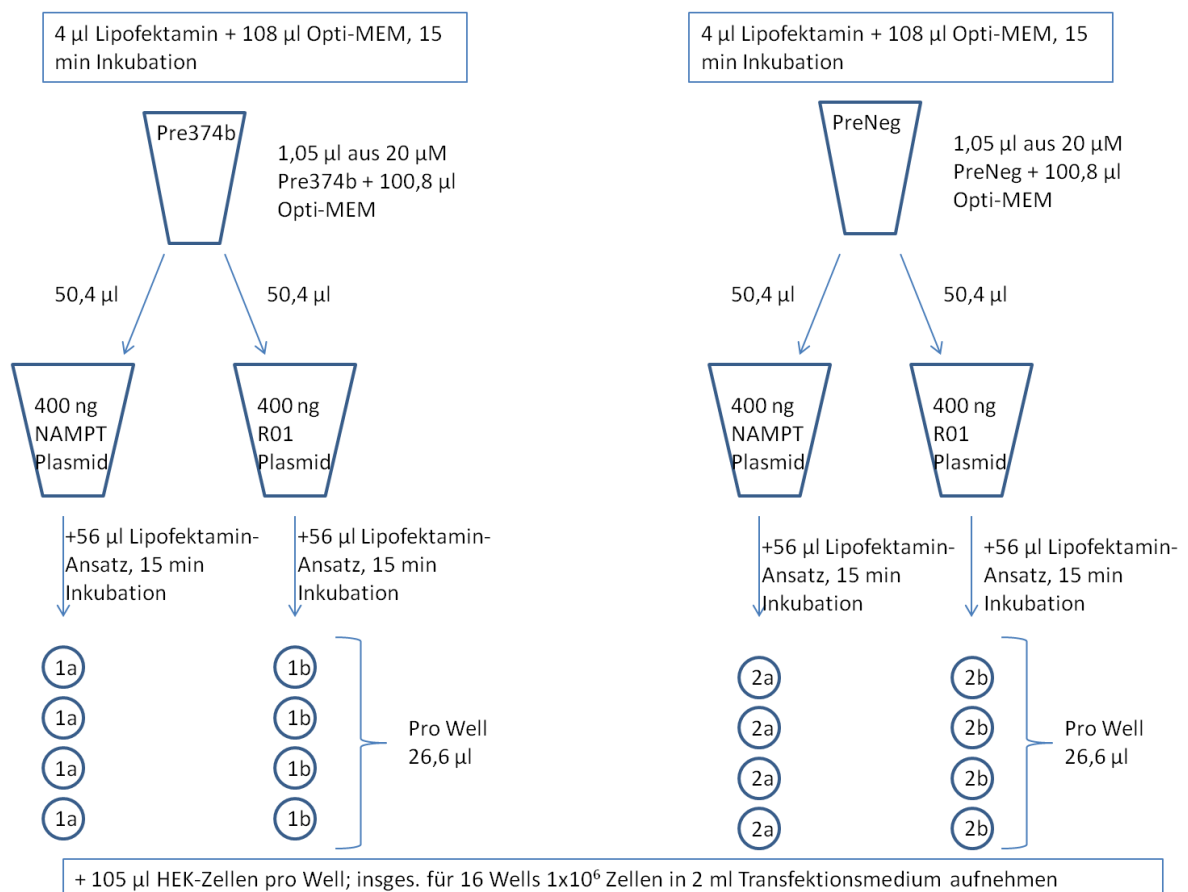


Abbildung 19: Pipettierschema zur Transfektion von human embryonic kidney (HEK)-Zellen mit der pre-miRNA-374 (Pre374b), der Negativkontrolle (PreNeg) sowie dem Nampt-Plasmid bzw. dem Kontroll-Plasmid (R01)

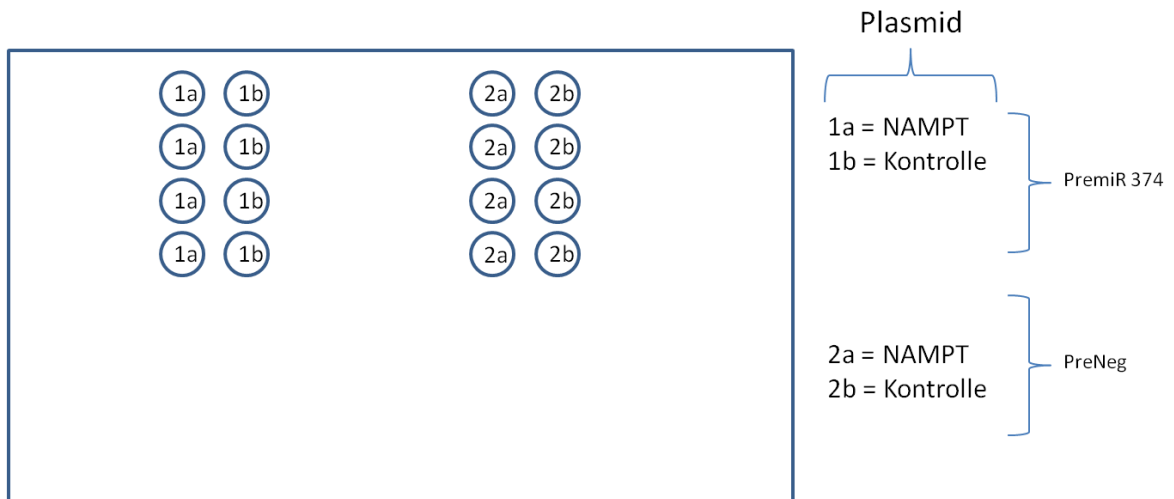


Abbildung20: Pipettierschema des Luciferase Assays an HEK-Zellen

1: Mit Pre-miRNA-374 (Pre-miR-374) oder 2: mit Negativkontrolle transfizierte human embryonic kidney (HEK)-Zellen, die jeweils a) den Nampt-Plasmid, oder b) den Kontroll-Plasmid enthalten.

4.2.29 *In-situ* Hybridisierung (ISH)

Die *in-situ* Hybridisierung ist ein hochsensitives und spezifisches Verfahren zum Nachweis einer gewebe- bzw. zellartspezifischen miRNA-mRNA Bindung (Hybridisierung) an kryokonservierten Gewebeschnitten (*in situ*). Es ist hiermit möglich, die miRNA-RNA-Bindung als Solche nachzuweisen, des Weiteren zusätzlich, in welcher Zellart die miRNA dominierend exprimiert wird. In der vorliegenden Arbeit sollte die Bindung von miRNA-374 an die mRNA von Nampt in Gewebeschnitten der Mäuseherzen nach Induktion eines Myokardinfarkts bzw. Herzen von kontrolloperierten Tieren gezeigt werden. Es sollte weiterhin gezeigt werden, in welcher Zellart innerhalb der Gewebeschnitte die miR-374 nach einem Myokardinfarkt dominierend exprimiert wird. Es wurde hierfür eine synthetisch hergestellte, an beiden Strangenden doppelt (5' und 3') Digoxigenin (DIG) markierte miRNA-Sonde eingesetzt, welche über Basenpaarung im Gewebeschnitt ihre *target* mRNA bindet. Es handelt sich bei den Sonden um sogenannte *locked nucleic acids* (LNAs). Da miRNAs mit 19 - 25 nt Länge sehr kurze RNA-Moleküle sind, ist es schwierig, mit konventionellen Sonden eine stabile Bindung an das entsprechende *target* RNA-Molekül zu erreichen. Durch die Inkorporation von LNAs wird durch die Stabilisierung der Konformation des Nukleotidstranges über die Fixierung des Zuckerringes mit Hilfe von Methylenbrücken die Affinität der Sonde zu deren *target* stark erhöht und die Bindung

wesentlich stabiler. Die Detektion der Sonde erfolgte dann mit Hilfe eines Anti-DIG-Antikörpers. Es wurden miRCURY LNA™ microRNA *detection probes* der Firma Exiqon verwendet. Die *in-situ* Hybridisierung wurde nach dem Protokoll, wie es von Obernosterer et al.⁷⁸ beschrieben wurde, durchgeführt (Abb. 21).

Vorbereitung der Gewebeproben:

Zunächst wurde das Infarktareal für 30 min bei RT in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Danach wurde es in 30 % Saccharose in PBS über Nacht bei 4°C verbracht, um Gefrierartefakte am Gewebe während des Einfriervorgangs zu minimieren. Am Folgetag wurde das Gewebe in Tissue Tek® eingebettet, und im Kryostat wurden bei -20°C serielle Schnittserien (10 µm) angefertigt. Während der gesamten Prozedur wurde auf ein RNase-freies Umfeld geachtet, um eine unnötige RNA Degradation zu vermeiden. Die Schnitte wurden für 30 min bei RT getrocknet und nachfolgend für 10 min bei RT in 4 % PFA nachfixiert.

Zusammensetzung der Reagenzien:

- PBS - Diethylpyrocarbonat (DEPC):
2 ml DEPC in 2 l PBS (Lösung vor Gebrauch autoklaviert)
- DEPC - Wasser:
1 ml DEPC in 1 l Aqua dest. (Lösung vor Gebrauch autoklaviert)
- Acetylierungslösung:
295 ml DEPC-Wasser
4 ml Triethanolamin
500 µl konzentrierte Salzsäure
- Hybridisierungspuffer:
10 ml Formamide
5 ml 20 x SSC
2 ml 50 x Denhardts
250 µl 20 mg/ml Yeast
1000 µl 10 mg/ml *salmon sperm* DNA
0,4 g Roche *blocking* Reagenz
1,75 ml DEPC-Wasser
- Denaturierungshybridisierungspuffer:
10 ml Formamid
5 ml 20 x SSC
2 ml 50 x Denhardts
250 µl 20 mg/ml Yeast
1000 µl 10 mg/ml *salmon sperm* DNA

- | | |
|---------|-------------------------------|
| 0,4 g | Roche <i>blocking</i> Reagenz |
| 500 µl | Chaps 10 % |
| 100 µl | Tween 20 % |
| 1150 µl | DEPC-Wasser |
- Probenmix: (150 µl/Objektträger)
LNA-DIG-markierte Sonde 1:12,5 in Denaturierungshybridisierungspuffer
 - B1 - Lösung:

100 ml	1 M Tris pH 7,5
30 ml	5 M Natriumchlorid

 Auf 1 l auffüllen mit sterilem *Aqua dest.*
 - B3 - Lösung:

200 ml	0,5 M Tris, pH9,5, in 0,5 M Natriumchlorid
50 ml	1 M Magnesiumchlorid

 auf 1 l auffüllen mit sterilem *Aqua dest.*
Lösung filtern
 - Blocking - Lösung: (für 20 ml)

2 ml	FCS
18 ml	B1
100 µl	10 % Tween
 - Fast Red - Developer-Lösung: (für 2 ml):

2 ml	0,1 M Tris-HCl, pH 8,2
1 Tablette	Fast Red

 3 min schütteln, filtern und sofort verwenden
 - NTB/BCIP - Developer-Lösung: (für 1 ml):

3,4 µl	Nitro-Blue Tetrazolium (NBT) 100mg/ml
3,5 µl	5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphat (BCIP) 50 mg/ml
2,4 µl	Levimasol 24 mg/ml
5 µl	10 % Tween
986 µl	B3-Lösung

Acetylierung:

Es folgte ein zweimaliges Waschen der Schnitte für jeweils drei min bei RT in PBS-DEPC. Im nächsten Schritt wurde die Acetylierungslösung vorbereitet. Diese musste für jede ISH frisch angesetzt werden. Es wurden 0,75 ml *acetic* Anhydrid zu der Acetylierungslösung pipettiert. Die Schnitte wurden nun in der fertigen Lösung für 10 min bei RT schüttelnd inkubiert. Die Acetylierung diente dazu, die positiven Ladungen der Aminosäuren der Proteine durch das Anhängen von Acetylresten abzuschirmen, um unspezifische Bindungen der negativ

geladenen Sonde zu reduzieren. Es folgte ein Waschschrift für 5 min bei RT in PBS-DEPC.

Proteinase K Verdau:

Im nächsten Schritt erfolgte der Protease K Verdau. Hierfür wurden die Schnitte für acht Minuten bei RT in 75 ml PBS-DEPC mit 37,5 µl Proteinase K Stocklösung (5 mg/ml in DEPC-Wasser) inkubiert. Als nächstes folgte die Inkubation der Schnitte für 10 min bei RT in Glycin-PBS-DEPC (2 mg/kg Glycin in PBS-DEPC), anschließend ein dreimaliger Waschschrift für drei jeweils 3 min bei RT in PBS-DEPC.

Prä-Hybridisierung und Hybridisierung:

Als nächstes wurden der Hybridisierungspuffer und die Hybridisierungskammer vorbereitet. Zur Herstellung einer Hybridisierungskammer wurde ein zylindrisches Glasgefäß verwendet, dessen Boden mit einem Zellstofftuch ausgelegt war, welches in 5 x SSC mit 50 % Formamid getränkt war. Es folgte die Prä-Hybridisierung für 4 - 8 h bei RT. Hierfür wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten horizontal in die vorgeheizte Hybridisierungskammer gelegt und mit 700 µl Hybridisierungspuffer pro Objektträger benetzt. Anschließend wurde der Hybridisierungspuffer von den Objektträgern abtropfen gelassen und der Probenmix mit den enthaltenen Sonden vorbereitet. Dieser wurde zunächst zur Denaturierung und damit Vorbereitung der Sonden für die Hybridisierung für fünf bei 80°C inkubiert und danach sofort auf Eis gekühlt. Es wurden 150 µl Probenmix pro Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden mit Deckgläsern bedeckt und über Nacht bei 55°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Die optimale Hybridisierungstemperatur hängt stark vom G-C-Gehalt von Sonde und Ziel-mRNA ab.

Stringenz-Waschungen:

Am nächsten Tag wurden die Objektträger in einem mit 60°C vorgewärmten 5 x SSC in 50% Formamid gewaschen, hierbei wurden die Deckgläser vorsichtig abgelöst. Es folgte ein einstündiges Waschen der Objektträger bei 60°C in 0,2 x SSC in 50% Formamid. Das Stringenz-Waschen, das heißt: das Waschen der

Schnitte in Salzpuffern sinkender Konzentration, diente dem Ablösen unspezifisch gebundener Nucleinsäuremoleküle. Als Nächstes wurden die Schnitte für 10 min bei RT in B1-Lösung gewaschen.

Immunhistochemie:

Zunächst wurde eine feuchte Kammer für die Immundetektion vorbereitet. Hierfür wurden in Wasser getränkte Zellstofftücher auf den Boden eines zylindrischen Gefäßes ausgelegt. Die Schnitte wurden horizontal in die Kammer gelegt und zunächst mit 500 µl *blocking* Lösung pro Objektträger für eine Stunde bei RT inkubiert. Die *blocking* Lösung musste immer frisch angesetzt werden. Nach dem ablaufen lassen der *blocking* Lösung folgte das Aufbringen der Antikörperlösung. Für die Antikörperlösung wurde der Anti-DIG-Alkaline Phosphatase Antikörper 1:2.000 in *blocking* Lösung verdünnt. Es wurden 500 µl pro Objektträger verwendet. Die Objektträger wurden über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst dreimalig für 5 min bei RT in B1-Lösung gewaschen.

Färbungen:

Die Schnitte wurden zunächst für 10 min bei RT für die Fast Red - Fluoreszenzfärbung in 0,1 M Tris-Salzsäure (pH: 8,2), für die NBT/BCIP - Färbung in B3-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Gewebsschnitte mit 150 µl Developer-Lösung benetzt, mit Deckglas bedeckt und Parafilm abgedichtet und in der Feuchtkammer inkubiert. Für die Fast Red - Fluoreszenzfärbung erfolgte die Inkubation mit der Developer-Lösung für 1,5 Stunden bei RT, für die NBT/BCIP – Färbung dauerte die Inkubation variabel 10 min bis zu 4 Tage, je nach miRNA-Expressionslevel der Probe. Es wurde hierbei auf eine blaue Farbentwicklung gewartet; diese wurde regelmäßig kontrolliert. Bei ausreichender Färbung wurden die Schnitte wie nachfolgend beschrieben gewaschen. Die abschließende Waschung der Schnitte nach beiden Färbungen erfolgte dreimalig für 10 min bei RT mit PBS mit 0,5% Tween. Im Folgenden wurden die Schnitte für 20 min bei RT mit 1:1.000 verdünnten 4',6- Diamidin-2-Phenolindol (DAPI) in *blocking* Lösung inkubiert. DAPI diente als fluoreszierendes, interkalierendes Agens zur Färbung (Markierung) von doppelsträngiger DNA. Somit konnte der

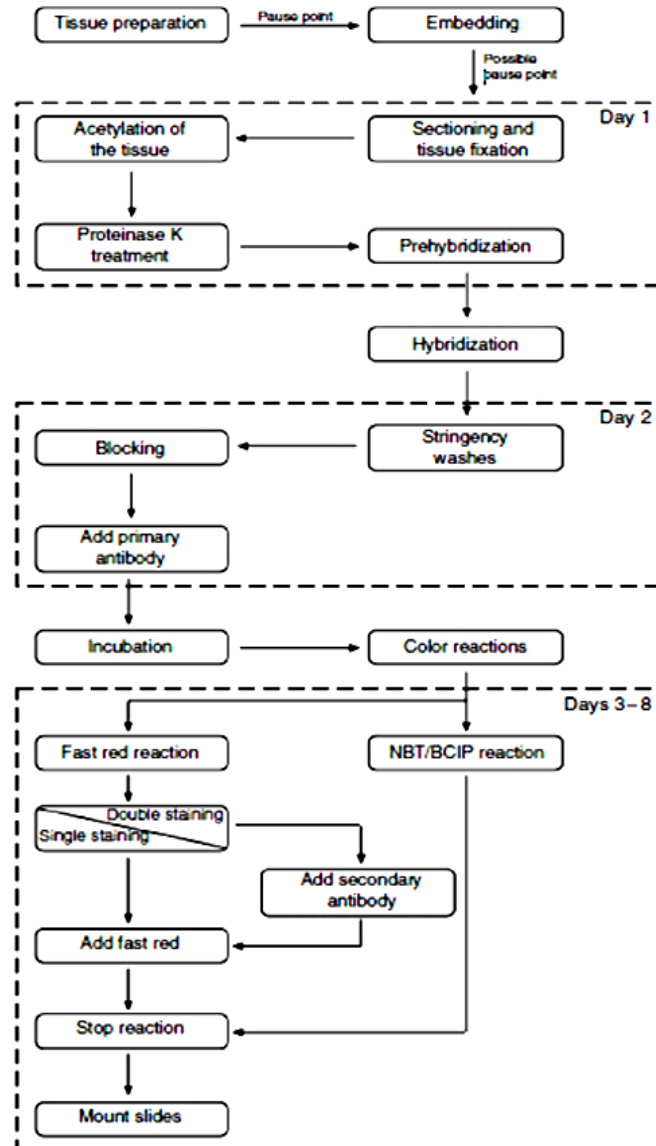


Abbildung 21: Schema zum Ablauf der in-situ Hybridisierung: (nach Obernosterer et al.; Nat Protoc; 2007)

Zunächst wird das Zielgewebe vorbereitet (Schritte 1-4). Hierzu wird das Gewebe in 30% Saccharose über Nacht eingelegt; nachfolgend wird die Probe in Tissue Tek® eingebettet und es werden Gefrierschnitte angefertigt.

Es folgt die eigentliche in-situ Hybridisierung (Schritte 5-26): Tag 1: Fixierung der Schnitte, Acetylierung, Proteinase K-Behandlung, Prähybridisierung und Start Hybridisierung; Tag 2: Stringenz-Waschungen, Blocken, Antikörper-Inkubation; Tage 3-8: Waschschritte, Sekundärantikörper-Behandlung, Färbung der Schnitte⁷⁸.

DNA-enhaltende Zellkern farblich vom Zytoplasma der Zelle abgehoben werden. Abschließend wurden die Objektträger in Mowiol (Polyvinylalkohol) eingebettet. Nach einer erfolgreichen ISH wird eine Rot- (Fast – Red – Färbung) bzw. Blau- (NBT/BCIP – Färbung) Färbung des Zytoplasmas sichtbar. Diese ist in der Kontrollprobe nicht sichtbar. Eine schwache, gleichmäßig auf den gesam-

ten Schnitt verteilte, unspezifische Hintergrundfärbung ist bei allen Proben möglich.

4.3. Statistische Auswertung

Die gezeigten Daten erwiesen sich als normalverteilt und wurden als Mittelwerte \pm mittlerem Standardfehler dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc.) mittels Student's t-test bei zwei Gruppen bzw. one-way ANOVA bei mehr als zwei Gruppen. Die Post-hoc Analysen wurden nach der Methode für multiple Vergleiche (Holm-Sidak) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant erachtet, wenn $P < 0,05$ war.

5 Ergebnisse

5.1 Nampt Expression

5.1.1 Nampt Expression nach Myokardinfarkt *in vivo*

Zum Beginn dieser Arbeit wurde zunächst die Expression von Nampt in Gewebeproben des murinen Infarktareals zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48, 72h) nach Induktion eines Myokardinfarktes durch die Ligatur der LAD am Herzen von C57Bl/6N-Mäusen auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Als Kontrolle dienten jeweils Gewebeproben von gleichalten Tieren, die der gleichen Operation unterzogen wurden, jedoch ohne eine Ligatur der LAD zu erhalten (= *sham* Operation). Die Genexpressionsraten wurde für jede Probe gegen diejenige des *house-keeping* Gens Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. Bei der Auswertung wurden die normalisierten Expressionsraten der Kontrollgruppe (*sham*) jeweils gleich 1,0 gesetzt. Auf mRNA-Ebene konnte mittels quantitativer *real-time* PCR zu allen drei Zeitpunkten eine hochsignifikante Reduktion ($p \leq 0,001$) der Nampt-Expression im Vergleich zu den Daten mit *sham* operierten Tieren errechnet werden (Abb. 22A). Bereits nach 24 h führte die Induktion eines Myokardinfarkts zu einer signifikanten Verringerung der relativen Genexpression von auf $0,031 \pm 0,4$, nach 48 bzw. 72 h nach Ligatur nachfolgend auf $0,021 \pm 0,11$ bzw. $0,016 \pm 0,22$.

Zur Untersuchung der Proteinexpression von Nampt in den Gewebeproben wurde eine semiquantitative Western Blot Analyse durchgeführt. Durch die densitometrische Auswertung der antikörpermarkierten Proteinbanden (Abb. 22B) und Normalisierung der Dichtewerte durch direkte Bezugnahme auf diejenigen für das jeweils als *house-keeping* Protein verwendete Enzym *cyclin-dependent kinase 4* (CDK-4) konnte in zwei Versuchsansätzen ebenfalls, zumindest ansatzweise, eine verminderte Nampt-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt dargestellt werden (Abb. 22C).

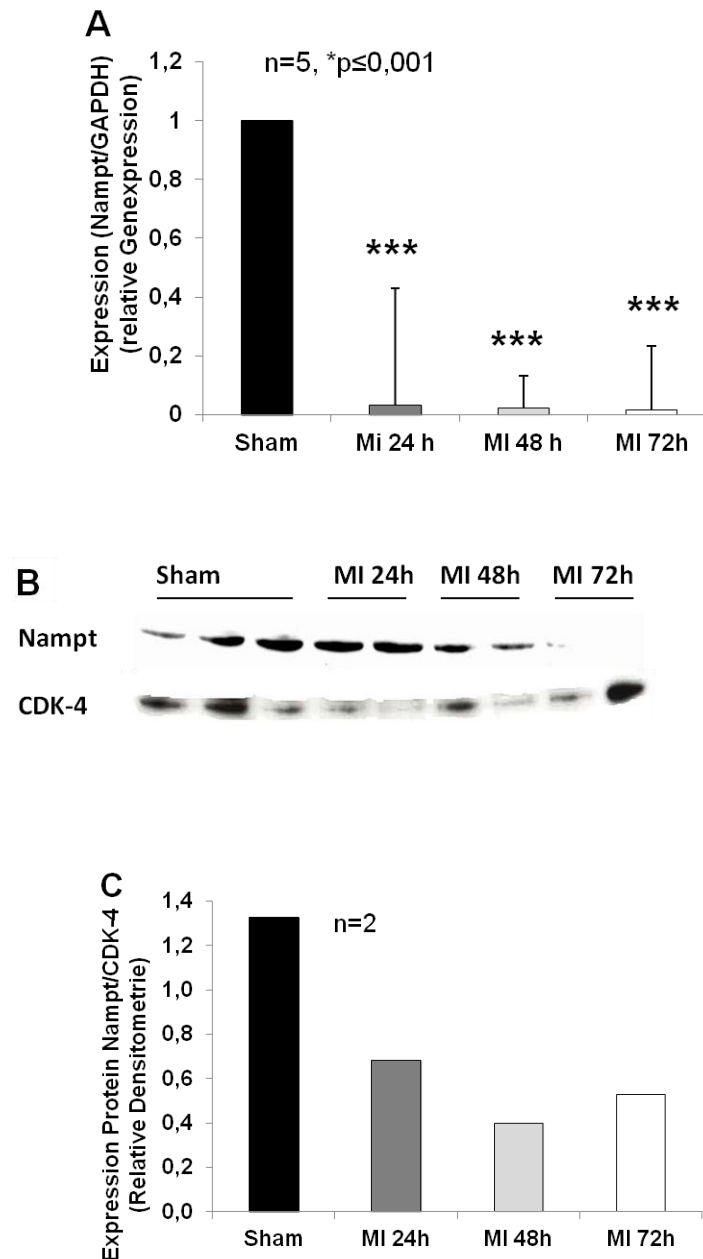


Abbildung 22: Expression von Nicotinamid Phosphoribosyltransferase (Nampt) im Infarktareal und gesunden Myokard der Maus auf mRNA- und Proteinebene

Expression von Nampt im Infarktareal zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48, 72 h) nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI) durch Ligatur der left anterior descending coronary artery (LAD), im Vergleich zu Myokardproben von sham operierten Mäusen ohne LAD-Ligatur.

A: mRNA Expression von Nampt bestimmt mittels real-time PCR und jeweils normalisiert auf die Expressionsrate von Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). N = 5, p≤0,001.

B: Expression von Nampt auf Protein-Ebene gemessen mittels Immunoblot, normalisiert auf die Expression von cyclin-dependent kinase 4 (CDK-4). N = 2

C: Semiquantitative Western Blot Analyse (Densitometrie) der in B dargestellten Proteinbanden. N = 2

5.1.2. Namp1 Expression in isolierten Zellfraktionen nach MI

Um die Herunterregulation von Namp1 auf zellulärer Ebene weiter differenzieren zu können, wurden Kardiomyozyten (CMC) aus Mäuseherzen 48 h nach Induktion eines Myokardinfarktes bzw. aus Herzen von *sham* operierten Tieren isoliert. Des Weiteren wurde den Tieren vor Entnahme des Herzens Blut entnommen, aus dem die Leukozyten isoliert wurden. Nachfolgend fand erneut eine RNA-Isolierung mit anschließender quantitativer *real-time* PCR statt. Es sollte die Expression von Namp1 in den einzelnen Zellfraktionen des Myokards getrennt bestimmt werden. Hierzu wurden die Daten für die Gruppen der CMCs, der verbleibenden, endothelzellreichen Zellfraktion (EC) aus der CMC-Isolierung sowie näherungsweise für die in das Infarktgebiet einwandernden Entzündungszellen der Blut-Leukozyten der Mäuse ausgewertet. Bei der Auswertung wurde die jeweilige Kontrolle auf 1,0 gesetzt. Es zeigte sich in der *real-time* PCR eine signifikante Herunterregulation ($p \leq 0,05$) von Namp1 auf mRNA-Ebene ausschließlich in der endothelzellreichen EC-Fraktion (Abb. 23). So konnte eine Verringerung der relativen Genexpression auf $0,62 \pm 0,16$ detektiert werden. Die Genexpression wurde auch hier für jede Probe auf diejenige des „house-keeping“ Gens GAPDH normalisiert.

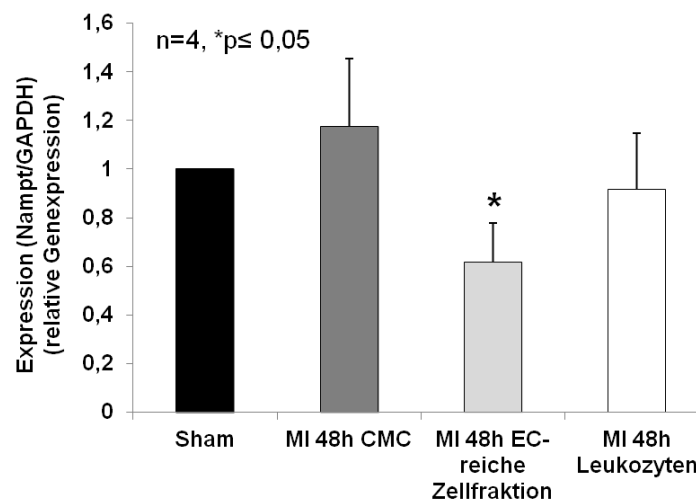


Abbildung 23: Namp1 mRNA Expression in isolierten Zellfraktionen nach Myokardinfarkt. Expression von Namp1 in Kardiomyozyten (CMC), der endothelzellreichen Zellfraktion EC isoliert aus Mäuserherzen sowie Leukozyten isoliert aus Blut 48 h nach Induktion eines Myokardinfarktes bzw. aus Herzen von *sham* operierten Tieren gemessen mittels quantitativer *real-time* PCR und jeweils normalisiert auf die Expressionsrate von Glycinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). $N = 4$, $p \leq 0,05$.

5.2 Expression von miRNA-374 nach Myokardinfarkt *in vivo* sowie in isolierten Zellfraktionen

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die verminderte Expression von Nampt nach Myokardinfarkt möglicherweise durch miRNAs reguliert wird, und sie damit experimentell bzw. therapeutisch beeinflusst werden kann. Durch die *in silico* Analyse von miRNA-Sequenzen des murinen sowie humanen Genoms mit Hilfe der an der Universität Heidelberg verfügbaren Datenbank (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/predictedmira-gene.php>) wurde unabhängig von drei Suchmaschinen (miRanda, miRWalk, PITA) die miRNA-374 (Maus) bzw. sequenzhomolog die miRNA-374b (Mensch) als potentiell Nampt-mRNA bindende miRNAs identifiziert (Tab. 6). Auf dieser Seite werden die Ergebnisse von acht etablierten miRNA *target* Berechnungsprogrammen zur Verfügung gestellt, die jeweils mit unterschiedlichen Algorithmen arbeiten. Sie dienen jeweils der Suche nach der potentiellen Bindung einer mRNA an verschiedene miRNAs einerseits und nach einer speziellen miRNA an mehrere potentielle *target* mRNAs andererseits (siehe auch Kap. 2.4.3 und 4.2.27).

Tabelle 6: *Ergebnisse der in silico Analyse der miRNAs, die Nampt beeinflussen, aus der interaktiven online Datenbank der Universität Heidelberg (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/predictedmirnagene.php>)*

In silico Analyse der potentiellen Bindung einer miRNA an die mRNA von Nampt unter Verwendung von acht verschiedenen target Berechnungsprogrammen: miRanda, miRWalk, PITA; nicht dargestellt: RNA22, RNAhybrid, Targetscan, DIANAmt, miRDB, PICTAR4, PICTAR5.

Gene Name	MicroRNA	StemLoop ID	miRanda	miRWalk	PITA	SUM
NAMPT	hsa-miR-374b	hsa-mir-374b	1	1	1	3

Da die Bindung einer endogenen, infarktinduzierten miRNA an die Nampt-spezifische mRNA eine Erklärung für die reduzierte Nampt-Expression nach Myokardinfarkt sein könnte, wurde untersucht, ob und wie die Expression von miRNA-374 nach Myokardinfarkt reguliert wird. Es wurden hierzu erneut Myokardproben zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48, 72 h) nach Induktion eines

Myokardinfarktes sowie die isolierten CMCs, die EC-reiche Zellfraktion aus der CMC-Isolierung und Leukozyten aus dem Blutes der operierten Mäuse verwendet. Nach der miRNA-Isolierung erfolgte wiederum die Durchführung einer quantitativen *real-time* PCR, und wiederum wurden die Expressionsdaten der *sham* operierten Tiere auf jeweils 1,0 gesetzt. Es zeigte sich zunächst eine signifikante Herunterregulation der relativen Genexpression der miRNA-374 nach 24 h, nachfolgend jedoch eine hoch signifikante Hochregulation ($p \leq 0,001$) ihrer Expression 48 h bzw. 72 h nach Myokardinfarkt mit relativen Werte von $3,90 \pm 0,26$ bzw. $7,87 \pm 0,10$ (Abb. 24A).

Auf zellulärer Ebene konnte ausschließlich in der die kardialen Endothelzellen enthaltenden Zellfraktion aus murinen Herzen nach CMC-Isolierung, im Vergleich zur EC-Zellfraktion der *sham* operierten Tiere, eine signifikante Hochregulation ($p \leq 0,05$) der miRNA-374 auf das $33,9 \pm 0,3$ fache detektiert werden. Die Genexpression wurde für jede Probe jeweils auf diejenige des *house-keeping* Gens *small nucleolar RNA-135* (sno-135) normalisiert (Abb. 24B).

5.3 Einfluss verschiedener Stimuli auf die Expression von Nampt und miRNA-374 in HCAECs

Im nächsten Schritt sollte festgestellt werden, welcher Einflussfaktor, der bei einem Myokardinfarkt auf die Zellen des Herzens einwirkt, hauptsächlich für die veränderte Expression von Nampt bzw. miRNA-374 verantwortlich gemacht werden kann. Da die Ergebnisse der Untersuchungen einer möglichen therapeutischen Beeinflussung der Angiogenese nach Myokardinfarkt beim Menschen dienen, wurden für die folgenden Experimente humane Koronarendothelzellen (HCAECs) verwendet. Es sollten somit die Erkenntnisse aus dem Mausmodell auf zellulärer Ebene auf die Zielspezies Mensch übertragen werden. Die HCAECs wurden *in vitro* mit unterschiedlichen Faktoren behandelt. Nachfolgend fand erneut eine RNA- und miRNA-Isolierung statt, anschließend wurde jeweils eine quantitative *real-time* PCR durchgeführt, um die Expressionsraten der Nampt-spezifischen mRNA sowie der miRNA-374 berechnen zu können.

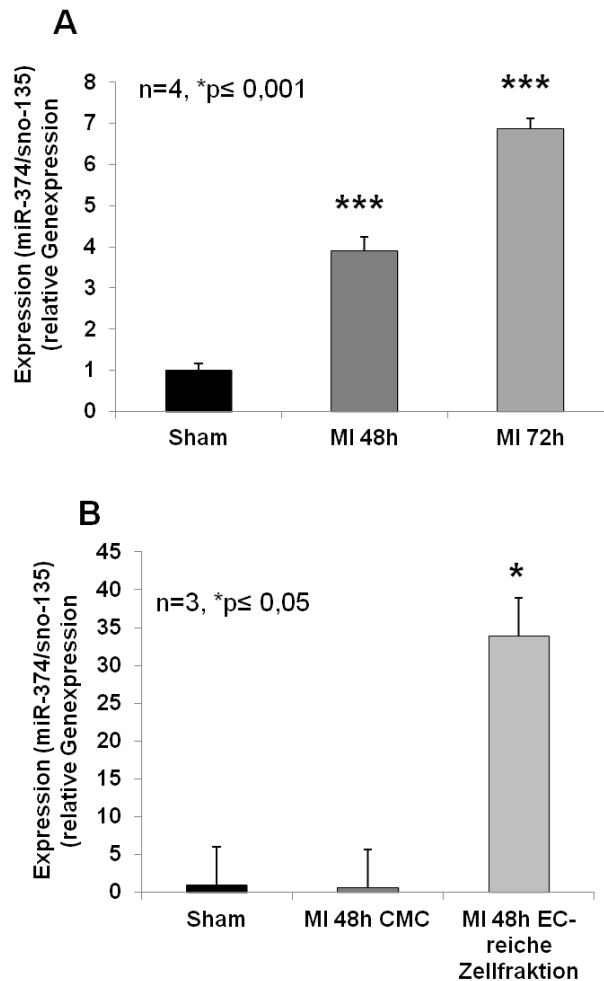


Abbildung 24: Expression von miRNA-374 im Infarktarel *in vivo* sowie kardialen Zellpopulationen *in vitro*

- A:** Expression von miRNA-374 im Infarktarel zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48, 72h) nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI) bzw. aus Herzen von sham operierten Tieren (keine LAD-Ligatur) gemessen mittels quantitativer real-time PCR und normalisiert gegen die Expressionsrate von small nucleolar RNA-135 (sno-135). N = 4, $p \leq 0,001$.
- B:** Expression von miRNA-374 in Kardiomyozyten (CMC), der endothelzellreichen Zellfraktion isoliert aus Mausherzen (EC) sowie Leukozyten isoliert aus Blut 48 h nach Induktion eines MI gemessen mittels quantitativer real-time PCR und normalisiert gegen die Expressionsrate von sno-135. N = 3, $p \leq 0,05$.

Für einen Wachstumsstimulus wurde das Medium der Zellen mit 10 % FCS versetzt, für einen inflammatorischen Stimulus mit einem Cocktail aus inflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1 β und INF- γ) (Inflam.) und für einen apoptotischen Stimulus mit H₂O₂ (siehe Kap. 4.2.22) Des Weiteren wurden die Zellen für 24, 48 und 72 h einer Hypoxie (Hyp.) mit einem Sauerstoffgehalt von lediglich 1 % ausgesetzt. Die Zellen wurden jeweils nach 24 h, für die

Hypoxiebehandlung nach 24, 48 und 72 h, geerntet. Als Kontrolle dienten jeweils ruhende HCAEC-Zellen in Basalmedium (BM). Im Rahmen der Datenauswertung wurden die Ergebnisse der BM-Kontrollen zu 1,0 und die Daten der behandelten HCAECs in Relation dazu gesetzt.

5.3.1. Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der Hypoxiekammer durch Expressionsanalyse für HIF-1 α in ECs

Die für die Hypoxiebehandlung verwendete Hypoxiekammer sollte zunächst auf ihre Funktionstüchtigkeit hin überprüft werden. Hierfür wurde die relative Genexpression des hypoxieinduzierten Faktors 1 α (HIF-1 α) in humanen HCAECs bestimmt, da HIF-1 α - und nachfolgend auch VEGF - unter Hypoxiebedingungen in diesen Zellen bekanntermaßen hochreguliert wird⁷⁹. Es zeigte sich erwartungsgemäß eine hoch signifikante Zunahme der HCAEC-spezifischen HIF-1 α Expression nach 24-stündiger Hypoxie (1 % O₂) (Abb. 25).

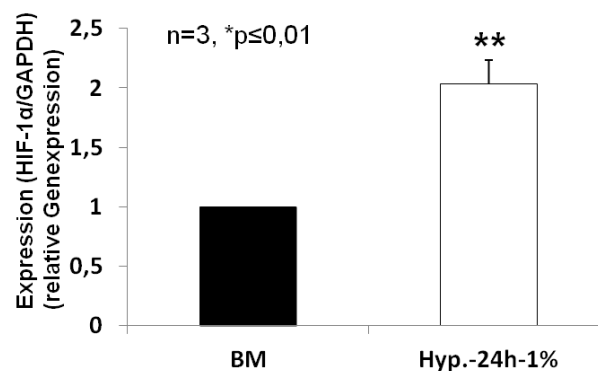


Abbildung 25: HIF-1 α Expression in humanen Koronarendothelzellen nach Hypoxiebehandlung

Unter hypoxischen Versuchsbedingungen (1 % O₂ für 24 h) konnte eine signifikante Zunahme der HIF-1 α Expression in humanen Koronarendothelzellen (HCAECs) mittels quantitativer real-time PCR, im Vergleich zu in Basalmedium (BM) kultivierten Zellen unter normoxischen Bedingungen sowie nach Normalisierung der Daten auf die Expressionsrate von Glycinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), bestimmt werden. N = 3, p \leq 0,01.

5.3.2 Expression von Nampt nach Faktoren-Behandlung

Eine Herunterregulation der Expression von Nampt konnte lediglich durch den Einfluss von Hypoxie nachgewiesen werden (Abb. 26B). So konnte nach 24 h Hypoxiebehandlung (1 % O₂) eine hochsignifikante (p \leq 0,01) Verringerung der relativen und normierten, Nampt-spezifischen Genexpression von 1,0 auf 0,49 \pm

0,11 sowie nach 72 h auf $0,61 \pm 0,14$ ($p \leq 0,01$) detektiert werden. Unter dem Einfluss des Wachstumsreizes (10 % FCS) sowie des Entzündungsreizes (Inflam.) konnte hingegen jeweils eine signifikante Hochregulation der relativen Genexpression von Nampt ermittelt werden.

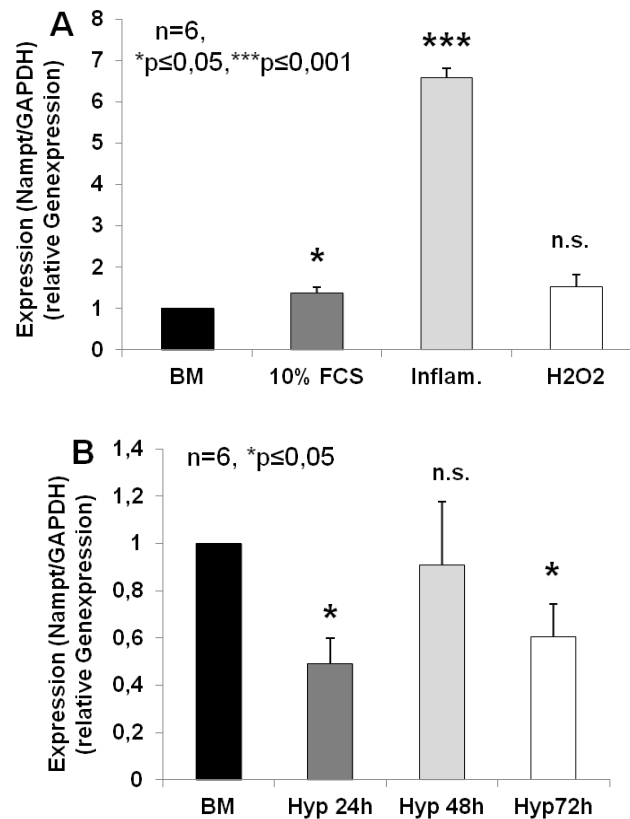


Abbildung 26: Expression von Nampt nach Stimulation von humanen koronaren Endothelzellen

Humanen koronare Endothelzellen (HCAECs) wurden stimuliert mit: Medium mit einem Wachstumsstimulus (10 % FCS), mit einem Cocktail aus inflammatorischen Zytokinen ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{INF-}\gamma$) (Inflam.) und für einen apoptotischen Stimulus mit H_2O_2 . Des Weiteren wurden die Zellen für 24, 48 und 72 h einer Hypoxie (Hyp.) mit einem Sauerstoffgehalt von 1 % ausgesetzt. Als Kontrolle dienten jeweils ruhende Zellen in BasalmEDIUM (BM).

A: Expression von Nampt nach Behandlung von HCAECs mit 10 %FCS, inflammatorischen Zytokinen sowie H_2O_2 , bestimmt mittels quantitativer real-time PCR und jeweils normalisiert auf die Expressionsrate von Glycinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). $N = 6$, p (10 % FCS) $\leq 0,05$, p (Inflam.) $\leq 0,001$.

B: Expression von Nampt nach Behandlung der HCAECs mit Hypoxie für 24, 48 sowie 72 h, bestimmt mittels quantitativer real-time PCR und jeweils normalisiert auf die Expressionsrate von GAPDH. $N = 6$, (Hyp 24 h) $\leq 0,05$, p (Hyp 72 h) $\leq 0,05$.

So kam es unter dem Einfluss von 10 % FCS zu einer signifikanten ($p \leq 0,05$), wenngleich marginalen Erhöhung der relativen Genexpression von auf relative Werte von $1,37 \pm 0,15$, durch die inflammatorische Stimulation zu einer hoch

signifikanten ($p \leq 0,001$) Erhöhung von $6,58 \pm 0,22$ (Abb. 26A). Die Genexpression wurde für alle Proben wiederum auf diejenige des *house-keeping* Gens GAPDH normalisiert.

Da die verminderte Expression von Nampt auf mRNA-Ebene hauptsächlich durch den Einfluss von Hypoxie detektiert werden konnte, sollte die Expression von Nampt auf Protein-Ebene unter dem Einfluss von Hypoxie ebenfalls untersucht werden. Hierfür wurde eine semiquantitative Western Blot Analyse durchgeführt. Durch die densitometrische Analyse der antikörpermarkierten Proteinbanden (Abb. 27A) und Normalisierung der Dichtewerte durch direkte Bezugnahme auf denjenigen für das jeweils als *house-keeping Protein* verwendete Enzym GAPDH konnte in zwei Versuchsansätzen eine verminderte Nampt-Expression nach 48 h und 72 h Hypoxiebehandlung andeutungsweise dargestellt werden (Abb. 27B).

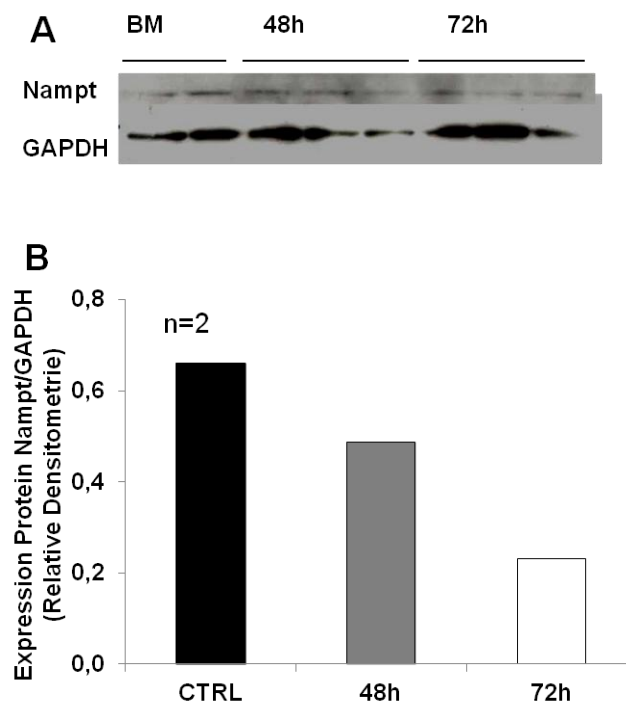


Abbildung 27: Proteinexpression von Nampt in kultivierten humanen Koronarendothelzellen nach Hypoxiebehandlung

Humane Koronarendothelzellen (HCAECs) wurden für 48 bzw. 72 h einer Hypoxie (Hyp.) mit einem Sauerstoffgehalt von 1 % ausgesetzt. Als Kontrolle dienten jeweils ruhende Zellen in Basalmedium (BM) unter Bedingungen der Normoxie.

A: Expression von Nampt auf Proteinebene, gemessen mittels Immunoblot und normalisiert auf die Expression von Glycinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). $N = 2$.

B: Semiquantitative Western Blot Analyse (Densitometrie) der in B dargestellten Proteinbanden. $N = 2$

5.3.3. Expression von miRNA-374 nach Faktoren-Behandlung

Die Expression der miRNA-374 erwies sich, zumindest die 72 h -Werte betreffend, in erster Linie nach Hypoxiebehandlung als signifikant ($p \leq 0,05$) hochreguliert, vergleichbar mit den Veränderungen nach Myokardinfarkt. Es konnte eine Erhöhung der relativen Genexpression für die miRNA-374 auf das $2,82 \pm 0,41$ fache der unter Normoxie erhaltenen Werte errechnet werden (Abb. 28B).

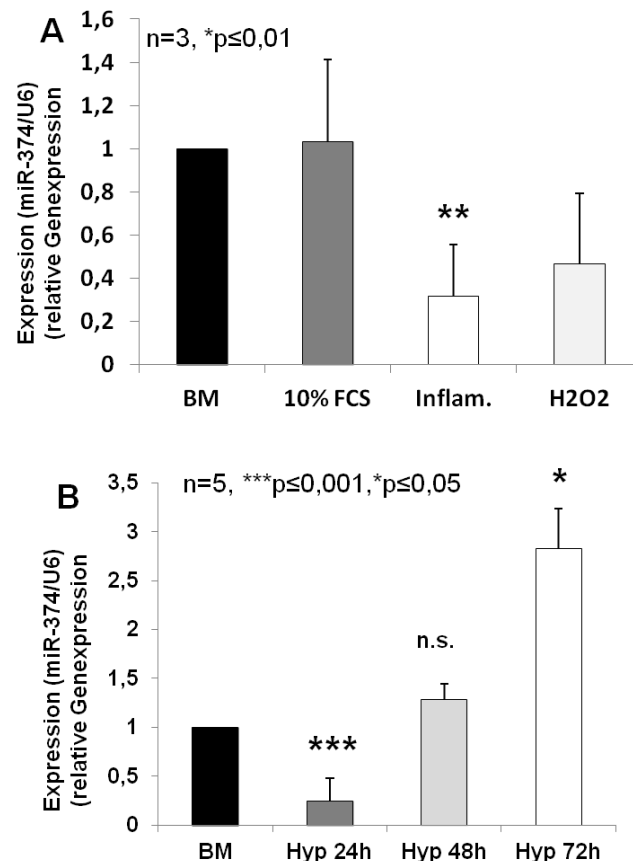


Abbildung 28: Expression von miRNA-374 nach Stimulation von humanen koronaren Endothelzellen

Humane Koronarendothelzellen (HCAECs) wurden stimuliert mit: Medium mit Wachstumsstimulus (10 % FCS), mit einem Cocktail aus inflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1 β und INF- γ) (Inflam.) und für einen apoptotischen Stimulus mit H₂O₂. Des Weiteren wurden die Zellen für 24, 48 und 72h einer Hypoxie (Hyp.) bei einem Sauerstoffgehalt von 1 % ausgesetzt. Als Kontrolle dienten jeweils ruhende Zellen in Basalmedium (BM).

A: Expression von miRNA-374 nach Behandlung der HCAECs mit 10 % FCS, inflammatorischen Zytokinen sowie H₂O₂, bestimmt mittels quantitativer real-time PCR und jeweils normalisiert auf die Expressionsrate von U6 non-coding small nuclear RNA(U6). N = 3, p (Inflam.) $\leq 0,01$.

B: Expression von miRNA-374 nach Behandlung der HCAECs mit Hypoxie, bestimmt mittels quantitativer real-time PCR und jeweils normalisiert auf die Expressionsrate von U6. N = 5, p (Hyp 24h) $\leq 0,001$ p (Hyp 72h) $\leq 0,05$.

Dabei bedingte die Hypoxie nach 24-stündiger Dauer jedoch zunächst eine hoch signifikant ($p \leq 0,001$) verminderte Expression der miRNA-374 auf relative Werte von lediglich $0,24 \pm 0,24$, während nach 48-stündiger Hypoxie keine Veränderung im Vergleich zu den Kontrolldaten zu verzeichnen war. Der Einfluss der Entzündungsfaktoren führte zu einer hoch signifikant ($p \leq 0,01$) verminderten Expression von miRNA-374 von $0,32 \pm 0,24$ (Abb. 28A), wohingegen sich die Wachstumsstimulation mit 10 % FCS sowie der apoptotische Stimulus (H_2O_2 Exposition) als unwirksam erwiesen (Abb. 28A).

5.4 *In situ* Nachweis der vermehrten Expression von miRNA-374 in kardialen Endothelzellen nach Myokardinfarkt

Als nächster Schritt sollte der *in situ* Nachweis der vermehrten Expression von miRNA-374 in Endothelzellen in Kryoschnitten von murinen Herzen nach Myokardinfarkt im Gegensatz zu solchen aus Herzen kontrolloperierter Tieren erfolgen. Hierfür wurde eine *in situ* Hybridisierung mit doppelt (5' und 3') DIG-markierten miRCURY LNA™ *microRNA detection probes* der Firma Exiqon durchgeführt. Es konnte jedoch auch nach mehrfacher Modifikation der experimentellen Bedingungen, wie unter anderem der Hybridisierungstemperatur, der Konzentration und Länge der Stringenz-Waschungen oder der Sondenkonzentration, keine spezifische Markierung von miRNAs erreicht werden.

5.5 Überexpression von miRNA-374 in HCAECs *in vitro*

Um den Einfluss von miRNA-374 auf die humanen Koronarendothelzellen *in vitro* näher zu untersuchen, wurde zunächst eine Überexpression dieser miRNA durch Transfektion der HCAECs mit der doppelsträngigen Precursor-Form der miRNA (pre-miRNA) erzeugt. Als Kontrolle wurde eine sogenannte „*scrambled*“ *nonsense* Basensequenz identischer Länge und vergleichbaren G / C Gehaltes eingesetzt. Beide Moleküle wurden mittels reverser Transfektion in die Zielzellen eingeschleußt, um die Auswirkung der miRNA-374 Überexpression auf Proliferation, Migration und mögliche Angiogeneseigenschaften der HCAECs zu charakterisieren. Die Überexpression entspricht *in vitro* näherungsweise der *in vivo* Situation im Herz, wo miRNA-374 nach Myokardinfarkt vermehrt exprimiert

wird (siehe Kap. 5.2). Die erfolgreiche Überexpression wurde im Folgenden zunächst mittels quantitativer *real-time* PCR nachgewiesen (Abb. 29). So konnte nach reverser Transfektion eine hochsignifikante ($p \leq 0,001$) Erhöhung der relativen Genexpression von miRNA-374 auf das $730,8 \pm 0,13$ fache - im Vergleich zu den mit *scrambled* Sequenz transfizierten Endothelzellen - in den HCAECs demonstriert werden (Abb. 29).

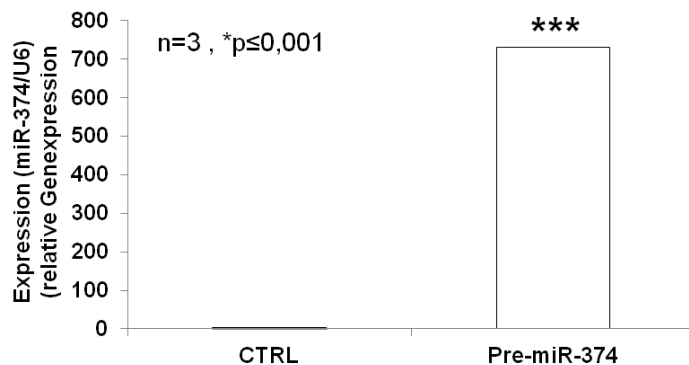


Abbildung 29: Überexpression von miRNA-374 in humanen Koronarendothelzellen

Überexpression von miRNA-374 in humanen Koronarendothelzellen (HCAECs) durch reverse Transfektion mit prä-miRNA-374 im Vergleich mit der „scrambled“ Negativkontrolle (CTRL), bestimmt mittels quantitativer *real-time* PCR und normalisiert auf die Expressionsrate von U6 non-coding small nuclear RNA(U6). N = 3, $p \leq 0,001$.

5.5.1 Expression von Nampt nach miRNA-374 Überexpression

Im nächsten Schritt sollte zunächst der Effekt der miRNA-374 Überexpression in HCAECs auf die Expression von Nampt sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene analysiert werden. Sollte die miRNA-374, wie *in silico* prognostiziert, zu einer Degradation der Nampt-spezifischen mRNA als Zielmolekül führen oder diese in ihrer Translation inhibieren, so müßte sich dies im Falle einer Degradation in einer verminderten Expression der Nampt mRNA, im Falle einer Inhibierung der Translation in einer verminderten Proteinexpression bemerkbar machen. Nach Durchführung einer quantitativen *real-time* PCR mit den Proben der transfizierten HCAECs konnte auf mRNA-Ebene keine signifikant veränderte, auf GAPDH mRNA normalisierte Expression von Nampt mRNA nach miRNA-374 Überexpression nachgewiesen werden (Abb.30A).

Zur Bestimmung der Proteinexpression von Nampt wurde eine semiquantitative Western Blot Analyse durchgeführt.

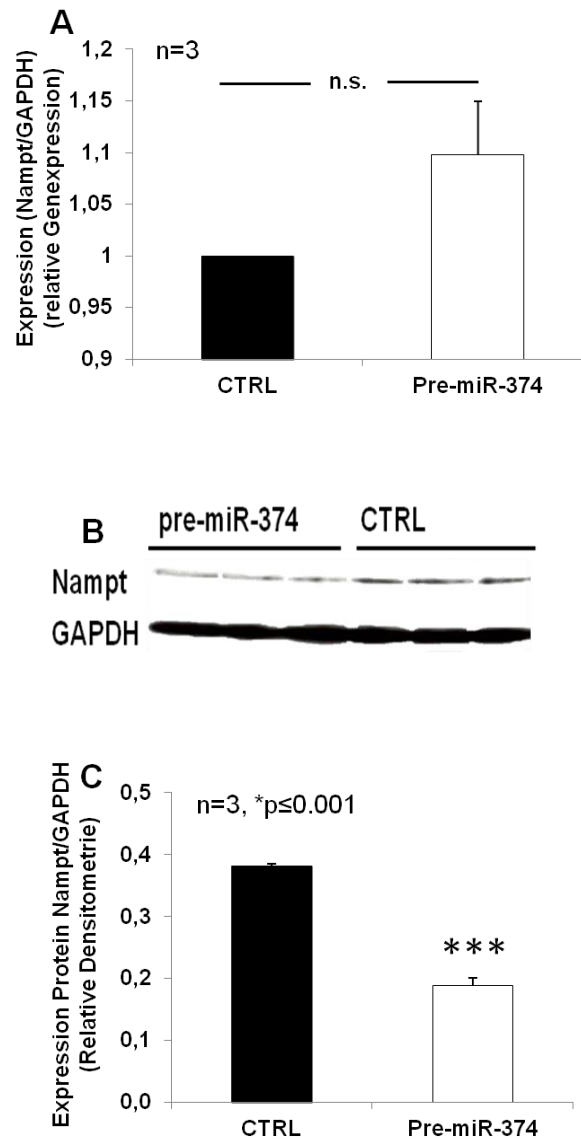


Abbildung 30: Expression von Nampt nach Überexpression mit pre-miRNA-374 in humanen Koronarendothelzellen

Überexpression von miRNA-374 in humanen Koronarendothelzellen (HCAECs) durch reverse Transfektion mit Pre-miRNA-374 im Vergleich mit der „scrambled“ Negativkontrolle (CTRL)

- A:** Expression von Nampt-spezifischer mRNA, bestimmt mittels quantitativer real-time PCR und jeweils normalisiert auf die Expressionsrate von Glycinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). N = 3.
- B:** Expression von Nampt auf Protein-Ebene, bestimmt mittels Immunoblot und normalisiert auf die Expression von GAPDH. N = 3.
- C:** Semiquantitative Western Blot Analyse (Densitometrie) der in B dargestellten Proteinbanden. N = 3, $p \leq 0,001$.

Durch die densitometrische Analyse der antikörpermarkierten Proteinbanden (Abb. 30B) und Normalisierung der jeweiligen Dichtewerte durch direkte Bezugnahme auf diejenige für das jeweils als *house-keeping* Protein verwendete Enzym GAPDH konnte in drei Versuchsansätzen eine hoch-signifikant ($p \leq 0,001$)

verminderte, normalisierte Nampt-Expression nach miRNA-374-Überexpression dargestellt werden (Abb. 30C). Offensichtlich hat die überexprimierte miRNA-374 also zu einer partiellen Hemmung der für Nampt spezifischen mRNA Translation geführt.

5.5.2 Angiogenese nach miRNA-374 Überexpression

Um die funktionellen Folgen einer miRNA Überexpression für die Angiogenese-eigenschaften von HCAECs zu evaluieren, wurde nach reverser Transfektion mit pre-miRNA-374 (bzw. der *scrambled* Negativkontrolle) ein *tube formation* Assay durchgeführt. Es erfolgte 24 h nach dem Aussähen der transfizierten HCAECs auf Matrigel eine bildanalytische Erfassung der kumulativen Länge der kapillären Sprosse im gebildeten Netzwerk in der jeweiligen Kulturschale mit Hilfe des digitalen Bildverarbeitungsprogramms MetaMorph® (vers. 7.1.3.0, Molecular Devices). Hierzu wurde die Länge aller sichtbaren kapillären Strukturen vermessen. Es zeigte sich, dass die Fähigkeit der Endothelzellen *tubes* auszubilden nach miRNA-374 Überexpression hoch signifikant ($p \leq 0,001$) reduziert war (Abb. 31). So wurde in den Proben der Kontrolle eine durchschnittliche *tube* Länge von $329 \pm 5 \mu\text{m}$, in den Proben der mit pre-miRNA-374 behandelten Zellen lediglich eine durchschnittliche *tube* Länge von $109 \pm 8 \mu\text{m}$ gemessen (Abb. 31A und B).

5.5.3 Funktionelle Assays nach miRNA-374 Überexpression

Um die verminderte Fähigkeit zur Angiogenese nach miRNA-374 Überexpression genauer zu charakterisieren, wurden nachfolgend einige funktionelle Assays durchgeführt. Da Endothelzellen im Verlauf der Angiogenese Phasen von Proliferation, Migration und Differenzierung durchlaufen, wurden diese Eigenschaften der HCAECs unter den Bedingungen einer miRNA-374 Überexpression im Folgenden untersucht.

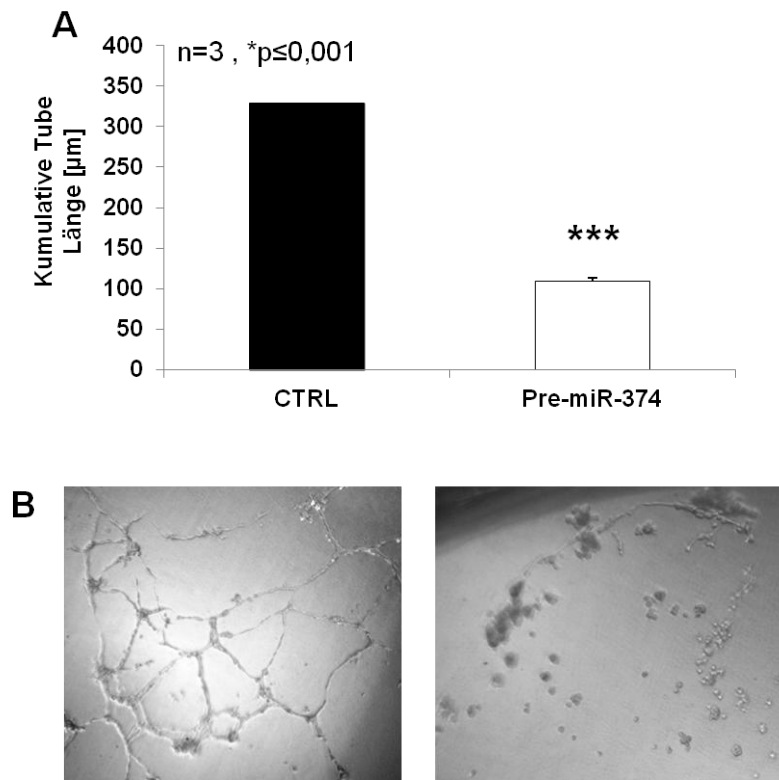


Abbildung 31: Angiogenese Assay nach miRNA-374 Überexpression in Kulturen humaner Koronarendothelzellen

Tube formation Assay nach miRNA-374 Überexpression in Kulturen humaner Koronarendothelzellen (HCAECs) nach Transfektion einer pre-miRNA-374 bzw. einer scrambled nonsense Basensequenz (CTRL). Die kumulative Länge der nach 24 h Inkubation gebildeten kapillären Sprosse auf Matrigel wurden mit Hilfe eines digitalen Bildverarbeitungsprogramms bestimmt.

A: kumulative tube Länge in µm. N = 3, p ≤ 0,001.

B: repräsentative Fotos je eines Wells des tube formation Assay, links: Kontrolle, rechts: nach miRNA-374 Überexpression.

5.5.3.1 Proliferation nach miRNA-374 Überexpression

Im Proliferationsassay wurde der kompetitive Einbau des Thymidin-Analogons 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU) in die DNA sich teilender Endothelzellen gemessen, wobei der BrdU-Einbau proportional zur Proliferationsaktivität der Zellen verläuft. Zur Markierung des BrdUs wurde ein monoklonaler Antikörper, konjugiert mit Peroxidase, verwendet. Die gebildeten Immunkomplexe wurden mit Hilfe der enzymatischen Umsetzung des Peroxidasesubstrates Tetramethyl-Benzidin sichtbar gemacht und mit Hilfe eines ELISA-Plattenlesers bei 450 nm gemessen und anschließend quantitativ ausgewertet.

Kombiniert wurde der Nachweis der Proliferation mittels BrdU-Inkorporation mit einem Test auf Viabilität der Zellen mittels WST-1. Lebende Zellen bewirken

hier eine enzymatische Umsetzung des rot gefärbten WST-1 in das dunkelrote Formazan. Der Farbumschlag wurde ebenfalls im ELISA-Plattenleser quantitativ erfasst. Es wurde für beide Versuche pro Probe und Kontrolle jeweils ein 6-fach Ansatz in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Kontroll-Proben wurden jeweils in BM und in GM kultiviert. Aus den Werten der gemessenen Absorption wurden zunächst der Mittelwert des 6-fachen Ansatzes für jede Probe bzw. Kontrolle gebildet. Die GM-Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt, die BM-Kontrolle sowie die Pre-miRNA-374 Proben wurden ins prozentuale Verhältnis zur GM-Kontrolle gesetzt.

Nach miRNA-374 Überexpression in HCAECs konnten keine signifikanten Veränderungen von Gesamtlebendzellzahl (Abb. 32A) und Anzahl proliferierender Zellen (Abb. 32B) im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden.

5.5.3.2 Migration nach miRNA-374 Überexpression

Das Migrationsverhalten von HCAEC wurde mit Hilfe von gelatinebeschichteten 24-Well-Transwellplatten untersucht. Die Einsätze der Platten bestanden an ihrer Unterseite aus einer Polycarbonatmembran mit unregelmäßig angeordneten, acht µm großen Poren, die eine Migration der Zellen ermöglichen. Die untere Kammer der Transwell-Platten wurde mit Medium, welches als Wachstumsreiz 10 % FCS sowie 50 ng/ml VEGF enthielt, gefüllt. Nach sechstündiger Inkubation wurden die Transwell-Einsätze in eine neue Platte mit WST-1 haltigem Medium gesetzt. Aufgrund der Metabolisierung des WST-1 durch die migrierten Zellen kam es zu einem messbaren Farbumschlag von rot nach gelb. Der Grad des Farbumschlags war proportional zu der Anzahl an migrierten Zellen und wurde mittels ELISA-Plattenleser bei 450 nm ausgewertet. Es wurde pro Probe und Kontrolle in GM jeweils ein 8-facher, für die Proben und Kontrollen in BM jeweils ein 4-facher Ansatz in eine 96-Well-Platte pipettiert.

Die pre-miRNA-374 sowie Kontroll-Proben wurden für den Migrationsversuch jeweils in BM und in GM kultiviert. Aus den Werten der gemessenen Absorption wurden zunächst der Mittelwert der Ansätze für jede Probe bzw. Kontrolle gebildet. Die GM-Kontrolle wurde auf 100 %, die BM-Kontrolle sowie die Pre-miRNA-374 Proben ins prozentuale Verhältnis zur GM-Kontrolle gesetzt.

Auch im Migrationsverhalten der Zellen konnten keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden (Abb. 32C).

5.6 *Knock-down* von miRNA-374 in HCAECs in vitro

Um nun - im Gegensatz zu den Studien mit miRNA-374 Überexpression - den Einfluss einer Inhibierung der miRNA-374 zu untersuchen, wurden die gleichen experimentellen Versuchsansätze, wie unter Kap. 5.5 dargestellt, nun auch nach einem *knock-down* der miRNA-374 wiederholt. Die Durchführung des *knock-down* erfolgte mit Hilfe eines O-methylierten miRNA-Inhibitormoleküls (anti-miRNA). Angiogenese koronarer Endothelzellen zu charakterisieren. Diese Versuche waren

Als Kontrolle wurde eine sogenannte „scrambled“ Kontrolle, eine willkürliche *nonsense* Sequenz, eingesetzt. Beide Moleküle wurden mittels reverser Transfektion in die Zielzellen eingeschleußt, um die Auswirkung der zumindest partiellen miRNA Blockade auf Proliferation, Migration und die vor allem im Hinblick auf die Nutzung einer miRNA-Inhibition als potentiell therapeutisches *target* von Interesse.

Die erfolgreiche Herunterregulation oder der „knock-down“ wurde wiederum mit Hilfe einer quantitativen *real-time* PCR nachgewiesen. Dabei wurde die auf U6 normierte Expression der miRNA-374 unter Kontrollbedingungen gleich 1,0 gesetzt. Nach reverser Transfektion der HCAECs mit der anti-miRNA konnte eine signifikante ($p \leq 0,05$) Verringerung der relativen, miRNA-374 spezifischen Genexpression auf $0,17 \pm 0,21$ in den HCAECs nachgewiesen werden (Abb 33).

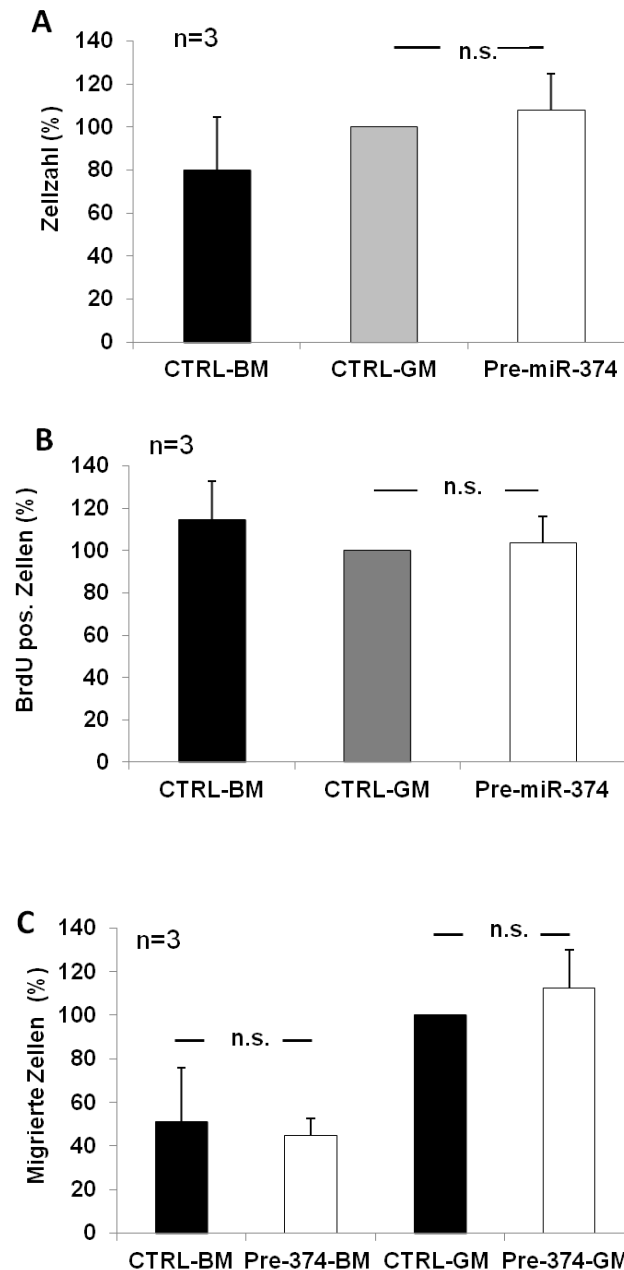


Abbildung 32: Funktionelle Assays nach miRNA-374 Überexpression in humanen Koronarendothelzellen

Nach reverser Transfektion humaner Koronarendothelzellen (HCAECs) mit pre-miRNA-374 und einer „scrambled“ nonsense Negativkontrolle (CTRL) wurden die Viabilität, das Proliferations- sowie das Migrationverhalten der HCAECs bestimmt.

- A:** Lebendzellzahl bestimmt mittels Umsatz von water soluble tetrazolium-1 (WST-1) in transfizierten HCAECs. Die Kontroll-Proben wurden jeweils in Basalmedium (CTRL-BM) und in growth medium (GM), welches fötales Kälberserum enthielt (CTRL-GM) kultiviert. Es wurde jeweils das prozentuale Verhältnis zu CTRL-GM bestimmt (= 100%). N = 3.
- B:** Proliferation gemessen mittels BrdU-Inkorporation in transfizierten HCAECs. Bestimmung des prozentuales Verhältnis zu CTRL-GM Werten (= 100%). N = 3.
- C:** Migration transfizierter HCAECs durch gelatinebeschichtete 24-Well-Transwellplatten. Die pre-miRNA-374 sowie Kontroll-Proben wurden jeweils in BM (CTRL-BM) und in GM (CTRL-GM) kultiviert. Es wurde das prozentuale Verhältnis zu CTRL-GM bestimmt (= 100%). N = 3.

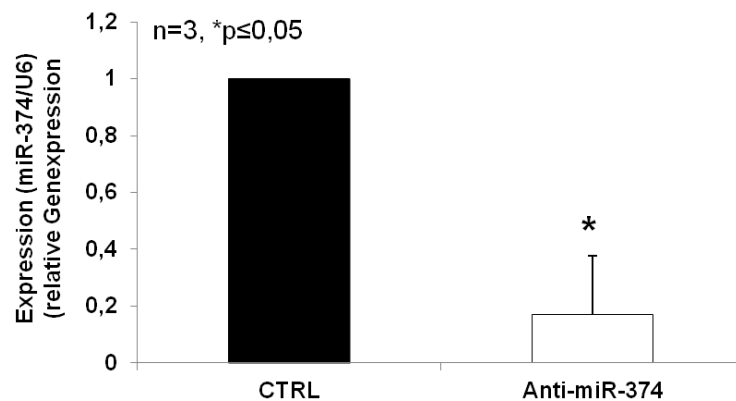


Abbildung 33: Knock-down von miRNA-374 in humanen Koronarendothelzellen

Knock-down von miRNA-374 in humanen Koronarendothelzellen (HCAECs) durch reverse Transfektion mit anti-miRNA-374 im Vergleich mit der „scrambled“ Negativkontrolle (CTRL), bestimmt mittels quantitativer real-time PCR und normalisiert auf die Expressionsrate von U6 non-coding small nuclear RNA(U6). N = 3, $p \leq 0,05$.

5.6.1 Expression von Nampt nach miRNA-374 *knock-down*

Auch nach miRNA-374 *knock-down* sollte die Expression von Nampt sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene untersucht werden. Nach Durchführung einer quantitativen *real-time* PCR mit den Proben der transfizierten HCAEC konnte auch nach miRNA-374 *knock-down* auf mRNA-Ebene keine signifikant veränderte Expression von Nampt nachgewiesen werden (Abb. 34A).

Zur Bestimmung der Proteinexpression von Nampt wurde erneut eine semi-quantitative Western Blot Analyse durchgeführt. Durch die densitometrische Analyse der antikörpermarkierten Proteinbanden (Abb. 34B) und Normalisierung der Dichtewerte durch direkte Bezugnahme auf diejenigen für das jeweils als *house-keeping* Protein verwendete Enzym GAPDH konnte in jeweils zwei Versuchsansätzen pro Membran bei der Auswertung von zwei Membranen ($n = 4$) eine signifikant ($p \leq 0,01$) erhöhte Nampt-Expression nach miRNA-374 *knock-down* dargestellt werden (Abb. 34C).

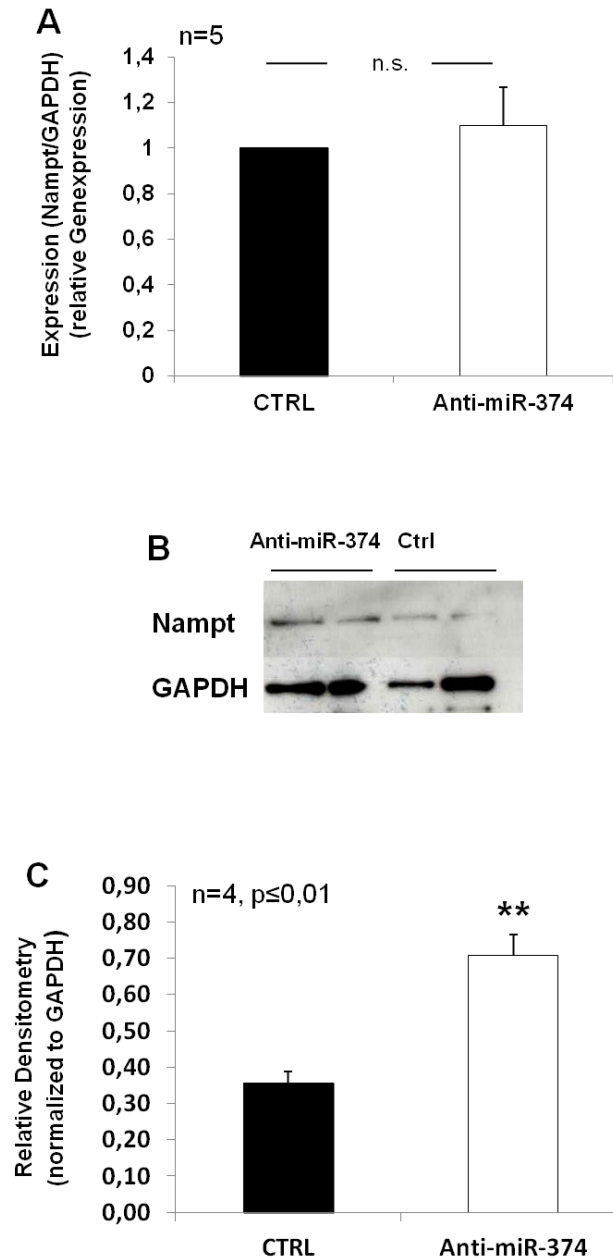


Abbildung 34: Expression von Nampt nach knock-down mit anti-miRNA-374 in humanen Koronarendothelzellen

Knock-down von miRNA-374 in HCAECs durch reverse Transfektion mit anti-miRNA-374 im Vergleich mit der „scrambled“ Negativkontrolle (CTRL)

A: Expression von Nampt gemessen mittels quantitativer real-time PCR und jeweils normalisiert auf die Expressionsrate von Glycinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). N = 5.

B: Expression von Nampt auf Protein-Ebene bestimmt mittels Immunoblot und normalisiert auf die Expression von GAPDH. N = 4.

C: Semiquantitative Western Blot-Analyse (Densitometrie) der in B dargestellten Proteinbanden. N = 4, p ≤ 0,01.

5.6.2. Angiogenese nach miRNA-374 *knock-down*

Um die funktionelle Bedeutung eines miRNA *knock-downs* für das Angiogeneseverhalten von HCAECs und letztendlich für eine schnelle Wiederversorgung des Herzens mit Sauerstoff- und Nährstoffen nach Myokardinfarkt zu evaluieren, wurde im Folgenden erneut ein tube formation Assay durchgeführt. Hierzu wurde erneut nach 24 h die kumulative Länge der kapillären Sprosse im gebildeten Netzwerk nach dem Aussähen der transfizierten HCAECs auf Matrigel gemessen. Es konnte im Vergleich mit der Kontrolle keine vermehrte Angiogeneseaktivität festgestellt werden (Abb. 35).

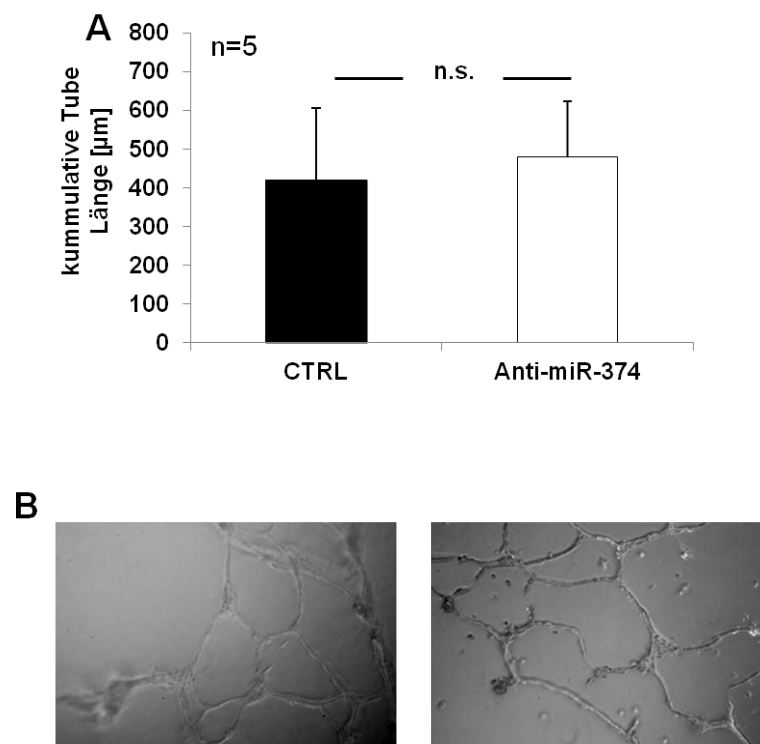


Abbildung 35: Angiogenese-Assay nach miRNA-374 *knock-down* in humanen Koronarendothelzellen

Tube formation Assay nach miRNA-374 knock-down in humanen Koronarendothelzellen (HCAECs) mit anti-miRNA-374 im Vergleich mit der Kontrolle (CTRL). Die kumulative Länge der nach 24 h Inkubation gebildeten kapillären Sprosse auf Matrigel wurden mit Hilfe eines digitalen Bildverarbeitungsprogramms bestimmt.

A: kumulative tube Länge in μm . N = 5.

B: repräsentative Fotos je eines Wells des tube formation Assay, links: Kontrolle, rechts: nach miRNA-374 knock-down.

5.6.3 Funktionelle Assays nach miRNA-374 *knock-down*

Es wurden nachfolgend erneut funktionelle Assays durchgeführt. Es wurden erneut die Viabilität von HCAECs sowie deren Proliferations- und Migrationseigenschaften unter den Bedingungen eines miRNA-374 *knock-down* untersucht. Die Versuche wurden analog zu den Assays nach miRNA-374 Überexpression ausgewertet (siehe Kap. 5.5.3). Im Proliferationsassay zeigten sich keine signifikanten Veränderungen von Gesamtlebendzellzahl und Anzahl proliferierender Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Auch im Migrationsassay konnten keine signifikanten Veränderungen der Migrationseigenschaft der Endothelzellen nachgewiesen werden (Abb. 36A-C).

5.7. Hypoxiebehandlung

Hypoxie hatte *in vitro* vergleichbare Einflüsse auf die Regulation von Nampt und miRNA-374 wie die Induktion eines Myokardinfarktes bei Mäusen *in vivo*. Unter dem Einfluss von Hypoxie kam es wie nach Induktion eines Myokardinfarktes zu einer signifikant verminderten Expression von Nampt sowie einer signifikant vermehrten Expression von miRNA-374 im Vergleich zur Kontrolle (siehe Kap. 5.1 und 5.2). Es war daher hinsichtlich einer potentiellen therapeutischen Intervention mit miRNA-374 von Interesse, die Effekte eines miRNA-374 *knock-down* unter Hypoxiebedingungen näher zu untersuchen.

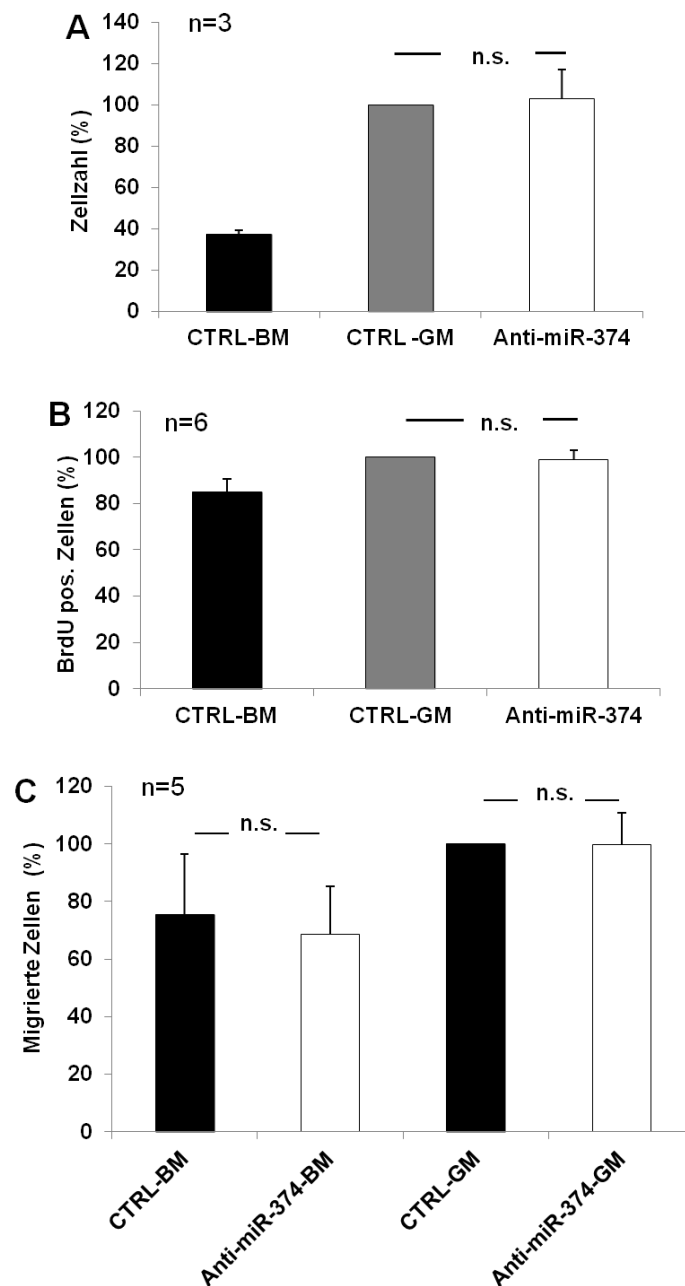


Abbildung 36: Funktionelle Assays nach miRNA-374 knock-down in humanen Koronarendothelzellen

Nach reverser Transfektion humaner Koronarendothelzellen (HCAECs) mit anti-miRNA-374 und einer „scrambled“ Negativkontrolle (CTRL) wurde die Viabilität, das Proliferations- sowie das Migrationverhalten der HCAECs bestimmt.

A: Zellzahl bestimmt mittels water soluble tetrazolium-1 (WST-1)-Umsatz in transfizierten HCAECs. Die Kontroll-Proben wurden jeweils in Basalmedium (CTRL-BM) und in growth medium (GM), welches fötales Kälberserum enthielt (CTRL-GM), kultiviert. Es wurde das prozentuale Verhältnis zu CTRL-GM bestimmt (= 100 %). N = 3.

B: Proliferation bestimmt mittels BrdU-Inkorporation in transfizierten HCAECs. Es wurde das prozentuale Verhältnis zu CTRL-GM bestimmt (= 100 %). N = 6.

C: Migration von transfizierten HCAECs durch gelatinebeschichtete 24-Well-Transwellplatten. Die anti-miRNA-374 sowie Kontrollproben wurden jeweils in BM (CTRL-BM) und in GM (CTRL-GM) kultiviert. Es wurde das prozentuale Verhältnis zu CTRL-GM bestimmt (= 100 %). N = 5.

5.8. **Knock-down von miRNA-374 in HCAECs unter Hypoxie**

Für einen erfolgreichen *knock-down* der miRNA-374 unter Hypoxie war eine im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen ohne Hypoxie erhöhte anti-miRNA Konzentration von 150 nM notwendig. Der erfolgreiche *knock-down* wurde wiederum mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR nachgewiesen (Abb. 37). Nach reverser Transfektion der HCAECs konnte unter Hypoxiebedingungen nach 48 und 72h eine hoch signifikante ($p \leq 0,001$) Verringerung der relativen Genexpression von miRNA-374 von 1,0 auf (nach 48 h) $0,03 \pm 0,46$ und nach 72 h auf $0,05 \pm 0,21$ in den HCAECs nachgewiesen werden.

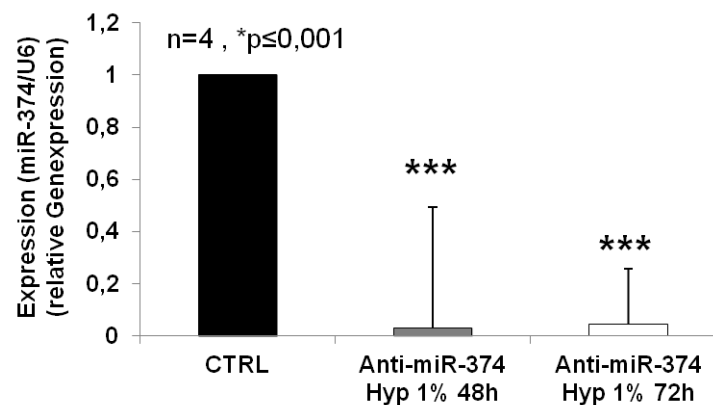


Abbildung 37: *Knock-down von miRNA-374 in humanen Koronarendothelzellen unter Hypoxie*

Knock-down von miRNA-374 in humanen Koronarendothelzellen (HCAECs) durch reverse Transfektion mit anti-miRNA-374 im Vergleich mit der „scrambled“ Negativkontrolle (CTRL) nach 48 und 72 h Hypoxiebehandlung (Hyp) bei 1 % Sauerstoffkonzentration, ermittelt mittels quantitativer real-time PCR und normalisiert auf die Expressionsrate von U6 non-coding small nuclear RNA(U6). N = 4, $p \leq 0,001$.

5.8.1 **Angiogenese nach miRNA-374 knock-down unter Hypoxie**

Erneut wurde das angiogenetische Potential der Endothelzellen mittels *tube formation* Assay untersucht. Die Fähigkeit der Endothelzellen, kapillar-ähnliche Gefäßstrukturen in Form von *tubes* auszubilden, erwies sich nach miRNA-374 *knock-down* sowie 72 h Hypoxiebehandlung im Gegensatz zu den Bedingungen unter Normoxie als signifikant erhöht ($p \leq 0,001$) (Abb. 38). So wurde in den Proben der Kontrolle lediglich eine durchschnittliche *tube* Länge von 245 ± 23

μm , in den Proben der anti-miRNA-374 transfizierten HCAECs jedoch eine durchschnittliche *tube* Länge von $515 \pm 15 \mu\text{m}$ gemessen.

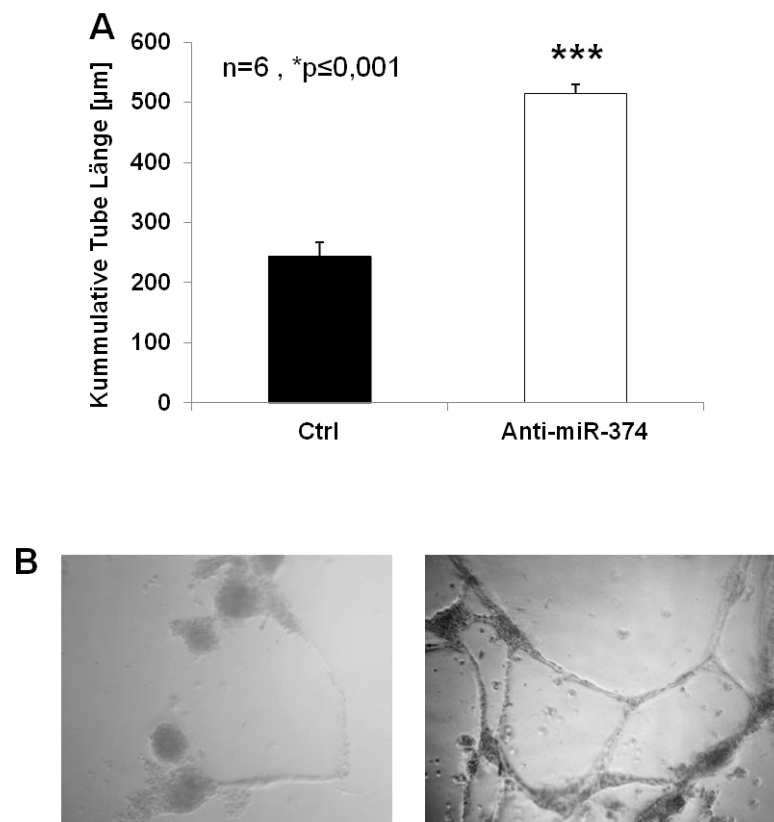


Abbildung 38: Angiogenese Assay nach miRNA-374 knock-down in humanen Koronarendothelzellen nach Hypoxiebehandlung

Tube formation Assay nach miRNA-374- knock-down in humanen Koronarendothelzellen (HCAECs) mit anti-miRNA-374 Transfektion im Vergleich mit der Kontrolle (CTRL). Die kumulative Länge der nach 72 h Hypoxiebehandlung mit 1% Sauerstoff gebildeten kapillären Sprosse auf Matrigel wurden mit Hilfe eines digitalen Bildverarbeitungsprogramms gemessen.

A: kumulative Tube Länge in μm . $N = 6$, $p \leq 0,001$

B: repräsentative Fotos je eines Wells des tube formation Assays, links: Kontrolle nach Hypoxiebehandlung, rechts: nach miRNA-374 knock-down nach Hypoxiebehandlung.

5.8.2 Funktionelle Assays nach miRNA-374 knock-down unter Hypoxie

Es wurden erneut funktionelle Assays durchgeführt, bei der die Viabilität, das Proliferations- und Migrationseigenschaften von HCAEC unter den Bedingungen eines miRNA-374 knock-down unter Hypoxie untersucht wurden. Die Versuche wurden analog zu den Assays nach miRNA-374 Überexpression und

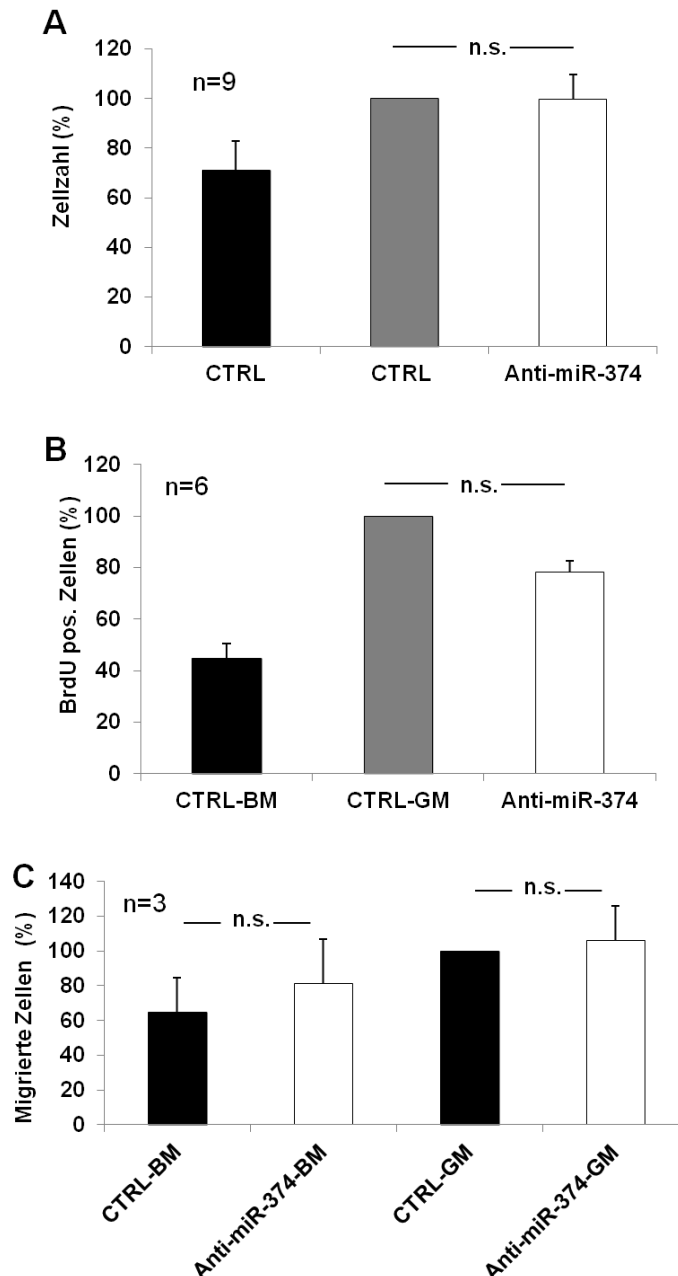


Abbildung 39: Funktionelle Assays nach miRNA-374 knock-down in humanen Koronarendothelzellen unter Hypoxiebehandlung

Nach reverser Transfektion von humanen Koronarendothelzellen (HCAECs) mit anti-miRNA-374 und einer „scrambled“ Negativkontrolle (CTRL) und anschließender 72 h Hypoxiebehandlung (1 % Sauerstoff) beider Gruppen wurde die Viabilität, das Proliferations- sowie das Migrationverhalten der HCAEC bestimmt.

- A:** Zellzahl bestimmt mittels water soluble tetrazolium-1 (WST-1)-Umsatz in transfizierten HCAECs. Die Kontroll-Proben wurden jeweils in Basalmedium (CTRL-BM) und in growth medium (GM), welches fötales Kälberserum enthält (CTRL-GM) kultiviert. Es wurde das prozentuale Verhältnis zu CTRL-GM bestimmt (= 100 %). N = 3.
- B:** Proliferation bestimmt mittels BrdU-Inkorporation in transfizierten HCAEC. Es wurde das prozentuale Verhältnis zu CTRL-GM bestimmt (= 100 %). N = 6.
- C:** Migration von transfizierten HCAECs durch gelatinebeschichtete 24-Well-Transwellplatten. Die anti-miRNA-374 sowie Kontroll-Proben wurden jeweils in BM (CTRL-BM) und in GM (CTRL-GM) kultiviert. Es wurde das prozentuale Verhältnis zu CTRL-GM bestimmt (= 100 %). N = 5.

knock-down ohne Hypoxie ausgewertet (siehe Kap. 5.5.3 und 5.6.3). Im Proliferationsassay zeigten sich keine signifikanten Veränderungen von Gesamtlebendzellzahl und Anzahl proliferierender Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Auch im Migrationsassay konnten keine signifikanten Veränderungen der Migrations-eigenschaft der Endothelzellen nachgewiesen werden (Abb. 39A-C).

5.9. **Knock-down von Nampt mit siRNA**

Vergleichend mit den Untersuchungen zum Effekt der miRNA-374 auf die Nampt Expression sowie auf das Proliferations-, Migrations- und Angiogenesepotential von Endothelzellen sollte im Folgenden untersucht werden, welche Folgen ein *knock-down* von Nampt selbst auf die entsprechenden Eigenschaften der Endothelzellen hat.

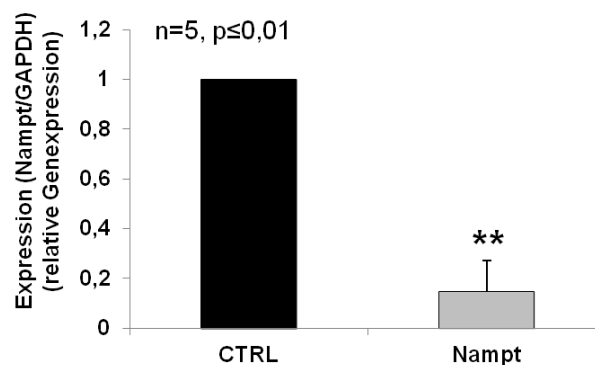


Abbildung 40: *Knock-down von Nampt in humanen Koronarendothelzellen mit siRNA*

Knock-down von Nampt in humanen Koronarendothelzellen (HCAECs) durch reverse Transfektion mit einer Nampt-spezifischen small interfering RNA (siRNA) im Vergleich mit der „scrambled“ Negativkontrolle (CTRL), bestimmt mittels quantitativer real-time PCR und normalisiert auf die Expressionsrate von Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). N = 5, p ≤ 0,01.

Der *knock-down* von Nampt erfolgte diesmal mit Hilfe einer synthetisch hergestellten siRNA. Diese wird ähnlich der Transfektion mit pre-miRNA oder anti-miRNA in die Zielzellen eingeschleußt, im Folgenden bindet die siRNA an die *target* mRNA und führt zu deren Degradation.

Die erfolgreiche *knock-down* wurde zunächst mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR nachgewiesen. Die Kontrolle wurde gleich 1,0 gesetzt. Nach reverser Transfektion von HCAECs mit der Nampt-spezifischen siRNA konnte eine signifikante ($p \leq 0,01$) Verringerung der relativen Genexpression von Nampt auf $0,15 \pm 0,13$ in den HCAEC demonstriert werden (Abb. 40).

5.9.1. Angiogenese nach Nampt *knock-down*

Das angiogenetische Potential der Endothelzellen wurde mittels *tube formation* Assay analysiert und quantitativ erfasst. Die Fähigkeit der Endothelzellen, kapillar-ähnliche Strukturen in Form von *tubes* auszubilden, erwies sich nach dem *knock-down* von Nampt als nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle verändert (Abb. 41).

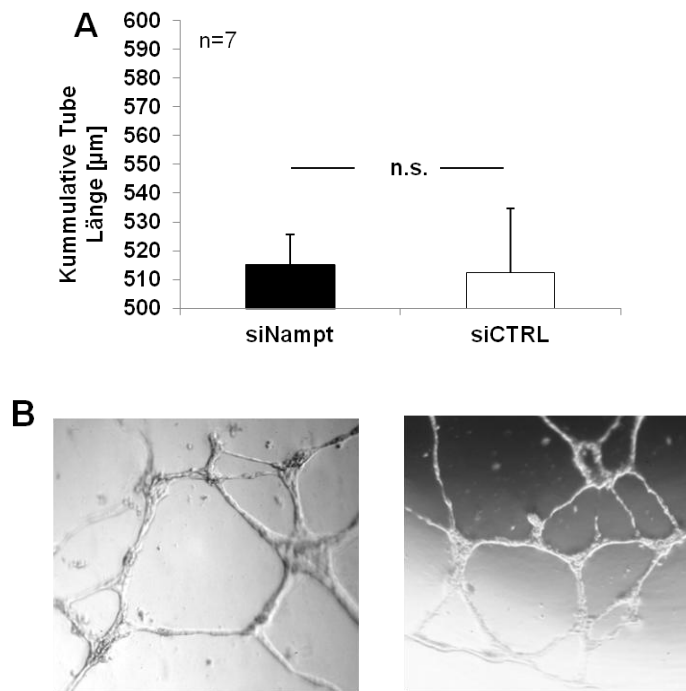


Abbildung 41: Angiogenese Assay nach Nampt-spezifischem *knock-down* in humanen Koronarendothelzellen mittels si-RNA

Tube formation Assay nach Nampt knock-down in humanen Koronarendothelzellen (HCAECs) mit small interfering RNA (siRNA = siNampt) im Vergleich mit der Kontrolle (CTRL). Die kumulative Länge der nach 24 h auf Matrigel gebildeten kapillären Sprosse wurde mit Hilfe eines digitalen Bildverarbeitungsprogramms bestimmt.

A: kumulative tube Länge in μm . N = 7

B: repräsentative Fotos je eines Wells des tube formation Assays, links: nach Nampt-*knock-down*, rechts: Kontrolle.

5.9.2. Funktionelle Assays nach Nampt *knock-down*

Es wurden erneut funktionelle Assays durchgeführt, bei der die Viabilität, das Proliferations- und Migrationseigenschaften von HCAEC unter den Bedingungen eines Nampt *knock-downs* untersucht wurden.

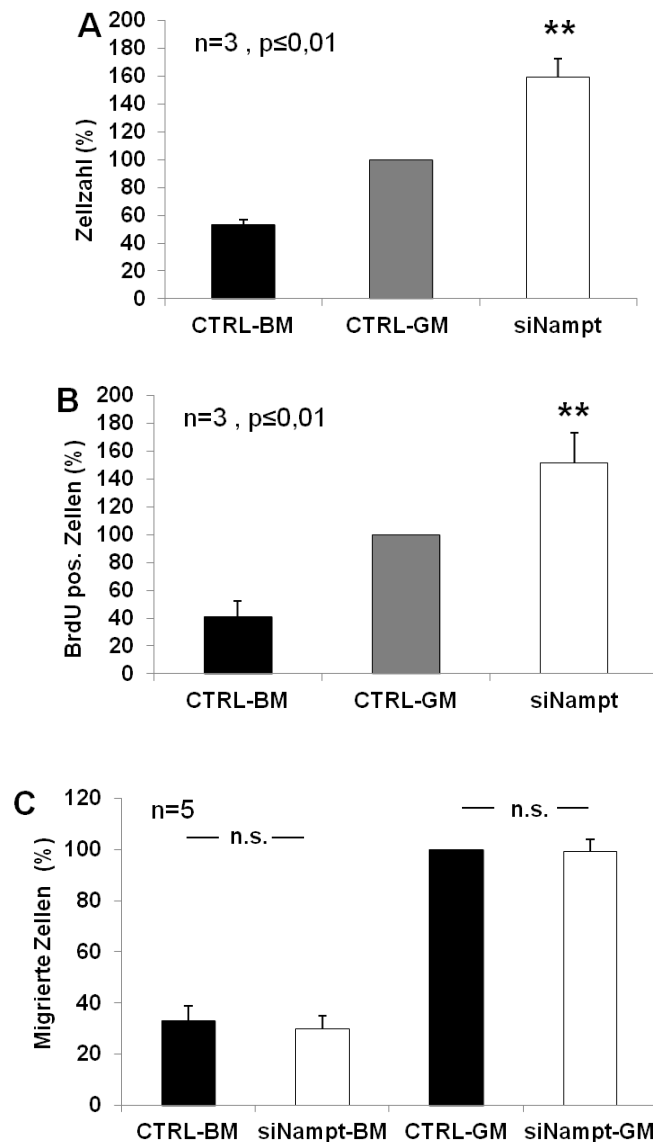


Abbildung 42: Funktionelle Assays nach Namp1 knock-down in humanen Koronarendothelzellen mittels siRNA

Nach reverser Transfektion humanen Koronarendothelzellen (HCAECs) mit Namp1-spezifischer small interfering RNA (siRNA = siNamp1) und einer „scrambled“ Negativkontrolle (CTRL) wurde die Viabilität, das Proliferations- sowie das Migrationverhalten der HCAECs bestimmt.

- A:** Gesamtlebenszellzahl bestimmt mittels water soluble tetrazolium-1 (WST-1)-Umsatz in transfizierten HCAECs. Die Kontroll-Proben wurden jeweils in Basalmedium (CTRL-BM) und in growth medium (GM), welches fötales Kälberserum enthält (CTRL-GM) kultiviert. Es wurde das prozentuale Verhältnis zu CTRL-GM bestimmt (= 100 %). N = 3, p ≤ 0,01.
- B:** Proliferation bestimmt mittels BrdU-Inkorporation in transfizierten HCAECs. Es wurde das prozentuale Verhältnis zu CTRL-GM bestimmt (= 100 %). N = 3, p ≤ 0,01.
- C:** Migration von transfizierten HCAECs durch gelatinebeschichtete 24-Well-Transwellplatten. Die siNamp1 sowie Kontroll-Proben wurden jeweils in BM (CTRL-BM) und in GM (CTRL-GM) kultiviert. Es wurde das prozentuale Verhältnis zu CTRL-GM bestimmt (= 100 %). N = 5.

Die Versuche wurden analog der Assays nach miRNA-374 Überexpression und *Knock-down* ausgewertet (siehe Kap. 5.5.3 und 5.6.3). Der WST-1-Umsatz zeigte eine signifikant ($p \leq 0,01$) erhöhte Gesamtlebendzellzahl unter dem Einfluss der Nampt siRNA von auf 159 ± 14 % der GM-Kontrolle (Abb. 42A). Auch im BrdU-Assay konnte eine signifikant ($p \leq 0,01$) verstärkte Proliferation der HCAECs auf 151 ± 22 % der GM-Kontrolle detektiert werden (Abb. 42B). Im Migrationsassay konnten dagegen keine signifikanten Veränderungen der Migrationseigenschaft der Endothelzellen nachgewiesen werden (Abb. 42C).

5.10. Luciferase-Assay

In einem letzten Schritt sollte die Bindung der miRNA an ihre potentielle *target* Nampt mRNA validiert werden. Hierfür wurden HEK-Zellen mit einem Vektor der Firma SwitchGear Genomics, der sowohl das Luciferasegen als auch die 3'UTR von Nampt enthielt, sowie mit der pre-miRNA-374 transfiziert. Als Kontrollen diente (1) eine pre-miRNA-374 Transfektion mit Kontrollvektor (RO1-Vektor) und (2) die Transfektion von Kontroll-pre-miRNA mit Nampt- und Kontrollvektor (siehe Kap. 4.2.28). Es wäre zu erwarten gewesen, dass durch die Bindung der miRNA-374 an die Nampt-3'UTR eine Hemmung der Luciferaseexpression inkl. verminderter Lumineszenz detektiert wird. Die anderen Kombinationen dienten als Positivkontrolle mit unveränderter/m Luciferaseexpression / Lumineszenz-Signal. Es wurde pro Probe und Kontrolle jeweils ein 4-facher Ansatz in eine 96-Well-Platte pipettiert. Aus den Werten der gemessenen Lumineszenz wurden zunächst der Mittelwert der Ansätze für jede Probe bzw. Kontrolle gebildet. Die Werte der Kontrolle mit Kontroll-miRNA und Kontroll-Plasmid wurde zu 100 %, die übrigen Proben ins prozentuale Verhältnis zu dieser Kontrolle gesetzt. Es konnte keine signifikante Reduktion der Luciferaseexpression nach pre-miRNA-374 / Nampt-Vektor Transfektion gezeigt werden (Abb. 43).

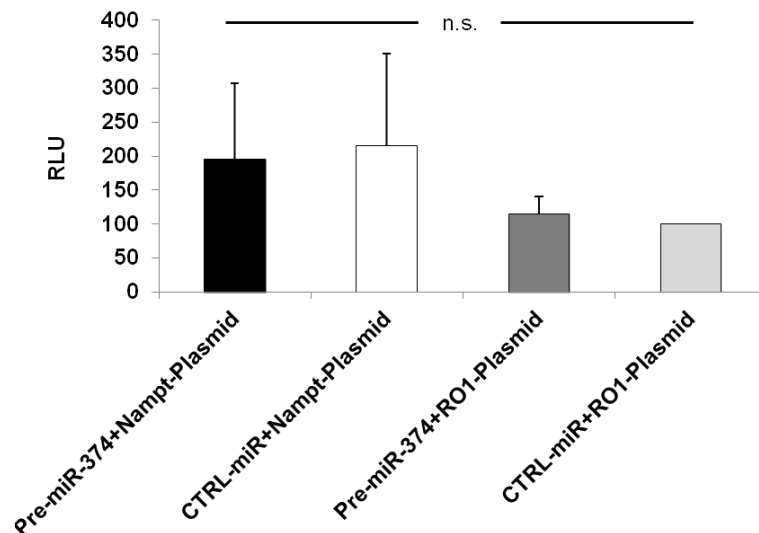


Abbildung 43: Luciferase-Assay

Human Embryonic Kidney (HEK) - Zellen transfiziert mit Pre-miRNA-374 (Pre-miR-374) oder der Negativkontrolle (CTRL-miR) sowie dem Nampt-Plasmid oder dem Kontroll-Plasmid (R01-Plasmid). Nach Zugabe des Luciferase Substrats wurde die Lumineszenz der Proben in relative light units (RFU) im Luminometer gemessen.

5.11. SIRT1 als potentiell *down-stream target* von Nampt

5.11.1 SIRT1 Expression nach Myokardinfarkt

Es wurde bereits beschrieben, dass Nampt über die Bereitstellung von NAD^+ in Stress-Situationen die Aktivität der Deacetylase SIRT1 direkt beeinflussen kann³⁴. SIRT1 ist damit ein potentiell *down-stream target* von Nampt, welches einige der Effekte der Nampt-Expressionsänderungen medieren könnte. Die Expression und Aktivität von SIRT1 wurde bereits unter anderen pathologischen Bedingungen wie oxidativem Stress, I/R und Bluthochdruck untersucht⁶⁰⁻⁶². Die Expression und Aktivität von SIRT1 nach Myokardinfarkt ist allerdings bisher noch unbekannt und sollte daher ebenfalls untersucht werden.

Die Expression von SIRT1 wurde ebenfalls in den Gewebeproben des Infarkt-areals zu den verschiedenen Zeitpunkten (24, 48, 72h) nach Induktion eines Myokardinfarktes analog zur Expression von Nampt auf mRNA- und Proteinebene charakterisiert. Als Kontrolle dienten erneut Gewebeproben *sham*-operierter Tieren. Bei der Auswertung wurde die Kontrollgruppe (*sham*) gleich 1,0 gesetzt. Auf mRNA-Ebene konnte mittels quantitativer *real-time* PCR zu allen drei Zeitpunkten eine hochsignifikante Reduktion ($p \leq 0,001$) der SIRT1-Expres-

sion im Vergleich mit den Daten der *sham* operierten Tieren detektiert werden (Abb. 44A).

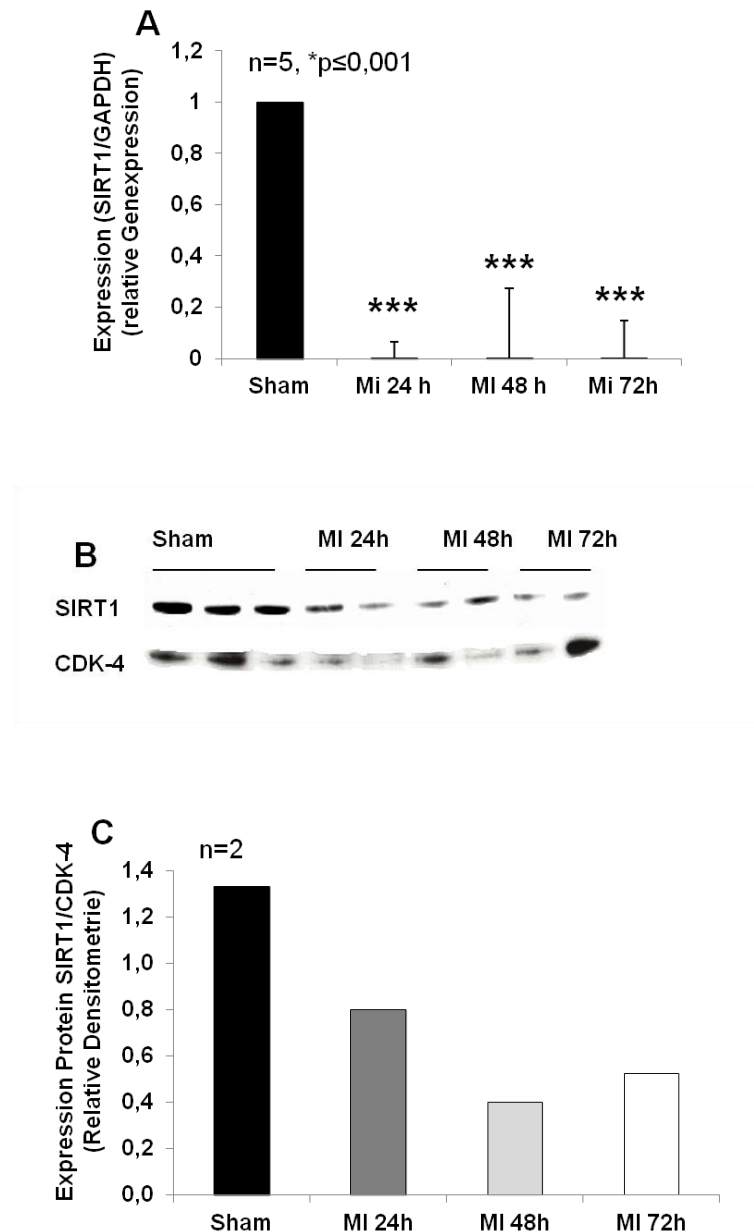


Abbildung 44: Expression von Sirtuin 1 (SIRT1) im Infarktareal und im gesunden Myokard der Maus auf mRNA- und Proteinebene

Expression von SIRT1 im Infarktareal zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48, 72 h) nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI) im Vergleich zu Myokardproben von sham operierten Mäusen ohne LAD-Ligatur.

- A:** mRNA Expression von SIRT1 bestimmt mittels real-time PCR und jeweils normalisiert auf die Expressionsrate von Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). N = 5, $p \leq 0,001$.
- B:** Expression von SIRT1 auf Proteinebene, bestimmt mittels Immunoblot und normalisiert auf die Expression von cyclin-dependent kinase 4 (CDK-4). N = 2,
- C:** Semiquantitative Western Blot Analyse (Densitometrie) der in B dargestellten Proteinbanden. N = 2.

Die Genexpression wurde für jede Probe gegen das *house-keeping* Gen GAPDH normalisiert. Bereits nach 24 h führte die Induktion eines Myokardinfarkts zu einer Verringerung der relativen Genexpression von auf $5 \cdot 10^{-5} \pm 0,06$, sowie 48 und 72 h nach Ligatur auf Werte von $3 \cdot 10^{-5} \pm 0,27$ und $4 \cdot 10^{-5} \pm 0,15$. Zur Untersuchung der Proteinexpression von SIRT1 in den Gewebeproben wurde eine semiquantitative Western Blot Analyse durchgeführt. Durch die densitometrische Analyse der antikörpermarkierten Proteinbanden (Abb. 44B) und Normalisierung der Dichtewerte durch direkte Bezugnahme auf denjenigen für das jeweils als *house-keeping* Protein verwendete Enzym CDK-4 konnte in zwei Versuchsansätzen eine verminderte SIRT1-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt dargestellt werden (Abb. 44C).

5.11.2 SIRT1 Aktivität nach Myokardinfarkt

Es wurde schließlich die Aktivität von SIRT1 in Gewebelysaten des Infarktareals mit dem Amplite™ Fluorometric HDAC *activity assay* Kit der Firma ABD Bioquest Inc. nach Proteinisolierung der Proben bestimmt (siehe Kap. 4.2.20). Als Positivkontrolle diente die HDAC *enzyme solution* des Kits. Als Negativkontrolle wurde Proteinprobenlösung mit Trichostatin A gemischt. Trichostatin A blockiert selektiv die Klasse 1- und Klasse 2-Histon-Deacetylasen, nicht jedoch die Klasse 3 zu der die Sirtuine gehören. Nach Zugabe der HDAC Green™ *substrate working solution* konnte die Intensität der Fluoreszenz bei excitation / emission (Ex/Em) = 490 / 525 nm gemessen werden.

Es wurde pro Probe ein Doppelansatz in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Für die Auswertung wurde zunächst die Hintergrundfluoreszenz des Buffers von den gemessenen Werten abgezogen. Als nächstes wurde der Mittelwert des Doppelansatzes bestimmt. Die Aktivität von SIRT1 war zu allen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt hoch signifikant ($p \leq 0,001$) reduziert (Abb. 45). Bereits nach 24 h konnte eine verminderte Aktivität von SIRT1 von $3,66 \pm 0,05$ auf $2,50 \pm 0,18$ gemessen werden. Nach 48 h war die Aktivität von SIRT1 noch weiter auf $1,95 \pm 0,16$ reduziert.

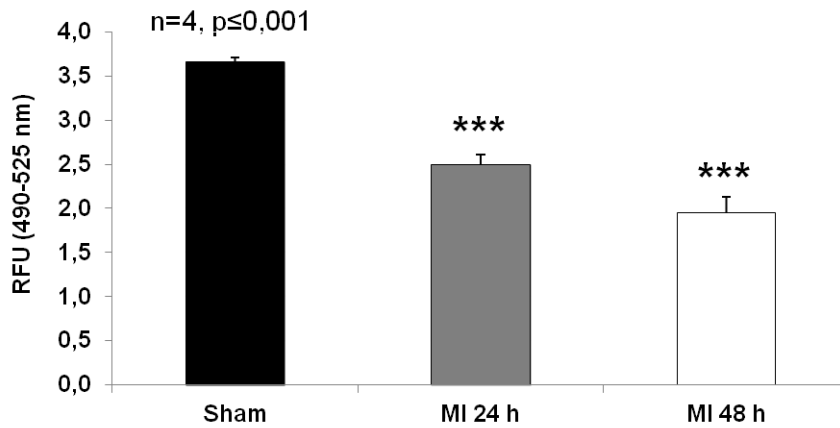


Abbildung 45: SIRT1-Aktivität im Infarktareal

Die SIRT1 Aktivität im Infarktareal zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48 h) nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI) im Vergleich zu Myokardproben von sham operierten Mäusen ohne LAD-Ligatur.

SIRT1 Aktivität gemessen als Fluoreszenzintensität in relative fluorescence units (RFU) gemessen bei excitation / emission (Ex/Em) = 490/525 nm. N=4, $p \leq 0,001$

6 Diskussion

6.1 Das Mausmodell zum Myokardinfarkt

6.1.1 Herzinfarkt-Modelle in der Forschung

Die beschriebene Induktion eines Myokardinfarkts bei C57BL\6N Mäusen stellt ein geeignetes Tiermodell zur Erforschung der pathophysiologischen Prozesse auf molekularer Ebene dar, die als Folge einer Ischämie für betroffene Zellen zu erwarten sind. Es konnte zudem bereits in einer Vielzahl von Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen die grundsätzliche Übertragbarkeit pathophysiologischer Prozesse der myokardialen Ischämie von der Maus auf den Menschen belegt werden^{80,81}. Das Modell ist bereits gut etabliert und bringt bei standardisierter Höhe der Ligatur reproduzierbare Infarktgrößen^{19,67}.

Dasjenige Tiermodell, welches dem Zustand während und nach Herzinfarkt beim Menschen jedoch am nächsten kommt, ist das Schweinemodell. Hier entspricht die Größe des Herzens, das Herzgewicht in Relation zum Körpergewicht, die kardiale und vaskuläre Anatomie, Physiologie und Elektrophysiologie am ehesten den Gegebenheiten beim Menschen. Des Weiteren ist bei Schweinen, wie beim Menschen auch, nur eine vernachlässigbare Kollateralversorgung am Herzen vorhanden⁸².

Es gibt allerdings mehrere Gründe, die trotzdem für die Verwendung des Mausmodells sprechen. Zum einen ist man aufgrund der Vorgaben aus dem Tierschutzgesetz gehalten, als Modellorganismus in der Forschung den Organismus mit der niedrigstmöglichen Entwicklungsstufe zu wählen [TierSchG §9 Abs. 2, (1)]. Zum anderen gibt es bisher eine große Vielfalt an “*knock-out*” Mäusen oder Mäusen mit genetischer Überexpression bestimmter Zielgene, bzw. gut etablierte Methoden, diese herzustellen, um spezifische Genfunktionen systematisch *in vivo* untersuchen zu können. Es hat sich zudem gezeigt, dass das Mausgenom und das menschliche Genom in der Entwicklung des Herzkreislauf Systems ähnlich reguliert werden. Des Weiteren haben Mäuse aufgrund ihrer geringen Größe, der kurzen Reproduktionszeiten und der Kosten weitere Vorteile gegenüber größeren Modellorganismen^{18,19}.

6.1.2 Limitationen des Tiermodells

6.1.2.1 Atherosklerose beim Tier

Der größte Unterschied zwischen Tier und Mensch bezüglich der Ausprägung eines Myokardinfarkts wird durch die unterschiedliche Anatomie des Herzens sowie Ätiologie und Pathogenese des Herzinfarkts an sich repräsentiert. Die häufigste Ursache für einen Myokardinfarkt beim Menschen stellt ein Thrombus in den Herzkranzgefäßen nach Ruptur einer atherosklerotischen Plaque dar⁶. Atherosklerose entsteht hierbei durch das Einwirken von Risikofaktoren auf das Gefäßendothel, wie u.a. Hypercholesterinämie, Bluthochdruck, *Diabetes mellitus* und Rauchen⁷ (siehe Kap. 2.1.3). Hypercholesterinämie findet man beim Hund vor allem im Rahmen von schweren Fällen der Hypothyreose. Hierbei entwickeln sich u.a. atherosklerotische Läsionen im Bereich der Koronar- sowie Nierenarterien. Die Cholesterinkonzentration im Serum sinkt zwar durch die Behandlung mit Thyroxin wieder ab, jedoch bilden sich die atherosklerotischen Veränderungen in der Regel nicht mehr zurück^{83,84}. In einem Fallbericht fand man bei einem sechs Jahre alten Dobermann mit cerebraler Nekrose generalisiert hochgradige Atherosklerose im Zusammenhang mit einer Hypothyreose⁸⁵. Beim Hund wurde Hypercholesterinämie und Atherosklerose des Weiteren im Zusammenhang mit insulinabhängigem *Diabetes mellitus* unabhängig von einer Hypothyreose beschrieben⁸⁶.

Der Atherosklerosetyp des Schweins entspricht am ehesten dem des Menschen. Die entsprechenden Intimaveränderungen findet man vor allem im Bereich der Zerebralarterien, Koronararterien, der *A. iliaca*, der Aorta und an Gefäßabzweigungen. Interessanterweise sieht man diese Veränderungen auch bei Wildschweinen, weswegen die Einflüsse durch Domestikation als Ursache weitgehend ausgeschlossen werden können⁸⁷. Eine weitere Pathogenese des Myokardinfarkts beim Tier scheint die im Rahmen von Endokarditiden der Mitralklappen vorkommende bakterielle Thromboembolie von Koronargefäßen zu sein. Beim älteren Hund werden Mikroinfarkte im Myokard bei der Sektion in Folge intramuraler Koronarymyloidose gefunden. Hierbei sind vor allem die Bereich der Papillarmuskeln betroffen⁸⁸.

Generell ist die Ausbildung eines Myokardinfarkts als Folge der beschriebenen atherosklerotischen Veränderungen beim Tier jedoch sehr selten und klinisch wenig relevant^{89,90}.

6.1.2.2 Unterschiede in der koronaren Gefäßversorgung

Einen weiteren Unterschied von Mensch und Tier stellt die unterschiedliche koronare Gefäßversorgung dar. Der Hauptunterschied besteht in der Versorgung von vergleichbaren Infarktarealen durch natürlich vorkommende Kollateralen bei den meisten tierischen Organismen im Gegensatz zum Menschen, was zu unterschiedlichen Infarktmustern der Spezies bei vergleichbarer Okklusion der LAD führt. So konnte festgestellt werden, dass sich beispielsweise bei sich anatomisch entsprechenden Ligaturen beim Hund lediglich ein subendokardialer Infarkt ausbildet, während dieser beim Schwein wie auch oft beim Mensch transmural ausgebildet ist⁹¹. Es bestehen außerdem Unterschiede im Versorgungsgebiet der LAD. Das durch die LAD beim Menschen versorgte Gebiet am Herzen beinhaltet die Vorderseite der linksventrikulären Wand sowie die vorderen zwei Drittel des interventrikulären *Septum*. Bei der Maus wird durch das vergleichbare Gefäß lediglich die freie linksventrikuläre Wand bis zum *Apex cordis*, nicht jedoch das *Septum*, versorgt. Es ist also zu beachten, dass die topographisch vergleichbare LAD der Maus nicht vollständig der funktionalen LAD des Menschen entspricht^{19,69}. Des Weiteren ist der Verlauf der LAD bei der Maus variabel. Entweder sie verläuft als einzelner großer Ast zum *Apex cordis* oder sie teilt sich kurz unterhalb des Herzohres in zwei größere Teiläste auf. Hier besteht beim LAD-Ligatur-Model die Gefahr einer Variabilität in der Infarktgröße, daher ist die Ligatur entsprechend breit zu gestalten⁶⁶.

6.1.2.3 Der Größenunterschied der Spezies

Die Unterschiede zwischen dem Modellorganismus Maus und dem Menschen in der Größe kann ebenfalls zu Schwierigkeiten bei der Übertragbarkeit der Ergebnisse führen. Zwar unterscheiden sich unterschiedlich große Säugetiere, weniger in der Zellgröße als in der Zellanzahl, und auch der Zellzyklus ist weitestgehend vergleichbar. Jedoch muss beispielsweise zur Neubildung von Gefäßen bei der Maus ein viel kleinerer Weg von einer präexistierenden Arteriole

zu einer kleinen Arterie überwunden werden. Durch die geringere Anzahl an Zellzyklen laufen solche Vorgänge bei kleineren Organismen auch in kürzerer Zeit ab. Allerdings besteht durch die höhere basale Stoffwechselaktivität von kleineren Organismen auch trotz schnellerer Regeneration eine verminderte Toleranz gegenüber (ischämischer) Zellschädigung. Ein weiterer Punkt ist die Infarktgröße und die damit verbundene Regenerationsfähigkeit. Durch die diffusionsbedingte Sauerstoffversorgung von den Randgebieten eines Myokardinfarktes (Grenzgebiete zum Infarktareal, Ventrikellumen, epikardiale Oberfläche während der experimentelle Thoraxchirurgie) können beim Schwein bis zu 15 % der minderperfundierten Region regeneriert werden und limitieren die Übertragbarkeit. Auch hier sind durch den Größenunterschied für die Maus ebenfalls höhere Werte zu erwarten. Jedoch kann dieser Zustand eventuell durch die höhere Empfindlichkeit gegenüber Ischämie bei kleineren Modellorganismen ausgeglichen werden⁹².

6.2 Die Regulation von Nampt nach Myokardinfarkt

6.2.1 Nampt ist nach Myokardinfarkt signifikant herunterreguliert

Es gibt mehrere Studien, die eine Schutzwirkung von Nampt für das Herz im I/R-Modell beschreiben. Zum einen konnte eine *in vitro* Studie, bei der humane Endothelzellen einem Apoptose-Stimulus in Form von H₂O₂ ausgesetzt wurden, zeigen, dass Nampt einen Schutz vor Apoptose vermittelt⁹³. Eine *in vivo* Studie, bei der Mäuse im I/R-Modell eine Injektion von Nampt zu Beginn der Reperfusionsphase erhielten, konnte zudem zeigen, dass dies zu signifikant kleineren Infarktflächen führte³⁸.

Die Regulation der Nampt-Expression wurde bisher bereits bei verschiedenen physiologischen und pathologischen Situationen, wie Adipositasentstehung und Glukosemetabolismus³⁶, Immunreaktionen⁹⁴, I/R sowie *pressure overload*³⁷ untersucht. Jedoch fehlt bis *dato* eine umfangreichere Expressionsstudie von Nampt nach Rahmen eines Myokardinfarktes. Hsu et al. konnten 2009 zeigen³⁷, dass Nampt zwei h nach Myokardinfarkt im Mausmodell sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant herunterreguliert war. Es gab allerdings bisher keine Information zur Expression von Nampt zu späteren Zeitpunkten nach

Myokardinfarkt. Da messbare Hinweise auf Apoptose nach Myokardinfarkt bei der Maus jedoch erst nach ca. 4 - 48 h, und Angiogenese im Periinfarktareal erst nach 3 - 4 Tagen zu beobachten sind, sollten in dieser Arbeit ebenso spätere Zeitpunkte untersucht werden⁸⁰. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nampt auch zu späteren Zeitpunkten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant herunterreguliert war (Abb. 22). Dies bedeutet, dass Nampt seine schützende und regenerative Wirkung im Infarktareal nach Myokardinfarkt wahrscheinlich langfristig nicht mehr entfalten kann. Interessant war es daher, eine Möglichkeit zu finden, die *down regulation* von Nampt zu hemmen und so die potentiell protektiven Eigenschaften von Nampt nach Myokardinfarkt auszunutzen können.

6.2.1.1 CDK4 als Ladungskontrolle

Beim Immunoblot wurde CDK4 als Ladungskontrolle verwendet. Die Ladungskontrolle beim Immunoblot zeigt an, ob alle Proben gleichmäßig geladen wurden, um im Anschluss die Expression des Zielproteins unter verschiedenen Bedingungen detektieren zu können. CDK4 repräsentiert ein etabliertes Ladungskontrollprotein⁹⁵⁻⁹⁷. In Gefäßzellen wird CDK4 unabhängig vom einwirkenden Stimulus exprimiert. Lediglich in einigen Tumoren ist CDK4 hochreguliert⁹⁸. Es war auch nach mehreren Wiederholungen der Proteinbestimmung und des Ladens des Gels problematisch, eine gleichmäßige Ausbildung der Kontrollbanden zu erreichen. Auch der Nachweis von anderen Ladungskontrollproteinen, wie Tubulin, GAPDH, Vinculin und Actin, brachte vergleichbare, unregelmäßige Ergebnisse. Es ist aufgrund der Vielzahl der eingesetzten Antikörper nicht davon auszugehen, dass die Unregelmäßigkeit der Banden von CDK4 mit einer Regulation des Kontrollproteins unter den gegebenen Bedingungen begründet werden kann, was es als Kontrollprotein unbrauchbar machen würde. Der Immunoblot konnte daher lediglich über die densitometrische Auswertung interpretiert werden.

6.2.2 Nampt ist vor allem in der endothelzellreichen Fraktion herunterreguliert

Nampt wurde nicht nur als protektives Protein zur Verringerung der Apoptose beschrieben, sondern auch als proangiogenetisches Protein. So konnte gezeigt werden, dass Nampt *in vivo* die Neovaskularisierung im Hühner-Chorioallantismembran-Modell sowie im Maus-Matrigel-Plug-Assay verstärkt. Des Weiteren verstärkt es die Migration, Invasion und *tube formation* in HUVECs⁴⁰.

Eine andere Studie zeigt ebenfalls eine gesteigerte Proliferation, Migration und *tube formation in vitro* in HUVECs sowie eine verstärkte Angiogenese in einem Nampt-angereicherten Matrigel-Plug und eine verbesserte Regeneration der Perfusion der Hinterextremität in einem Hinterlauf-Ischämie-Modell in der Maus *in vivo*⁴².

Es gibt bisher nur eine Studie, die den Einfluss von Nampt auf das Angiogeneseverhalten von HCAECs untersucht hat. In dieser Studie konnte eine erhöhte Proteinexpression von Nampt nach 4 - 6 stündiger Behandlung der Zellen mit einer 2,5-fach erhöhten Sauerstoffkonzentration in einer Überdruckkammer detektiert werden. Diese Wachstumsbedingungen hatten eine gesteigerte Migration- und *tube formation* Aktivität der HCAECs zur Folge. Die Behandlung mit Nampt siRNA verhinderte diese Effekte⁹⁹.

Die Nampt-geförderte Angiogeneseaktivität von Endothelzellen scheint über die Aktivierung der ERK1/2-Signalkaskade vermittelt zu werden. Die Inhibierung von ERK-Aktivierung hingegen führt zu einer Verminderung der Nampt-vermittelten *tube formation* von HUVECs^{40,93}. Neoangiogenese ist besonders im Hinblick auf eine Regeneration von entscheidender Bedeutung. Je besser die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des infarzierten Areals zumindest teilweise wiederhergestellt werden kann, desto weniger Zellen sterben ab, desto kleiner ist die zurückbleibende Narbe und umso besser die Prognose für den Patienten durch Verringerung der funktionellen Myokardschäden.

Die Idee dieses Projektes war es daher, die Mechanismen zu verstehen, die zu einer Herunterregulation der Nampt-Expression führen und darüber hinaus eine Möglichkeit zu finden, diese Herunterregulation der Nampt-Expression zu hemmen, um so die Angiogenese und Regeneration im Infarktareal zu fördern.

Daher sollte als nächster Schritt untersucht werden, in welchen Zellen innerhalb des Infarktareals die Herunterregulation von Nampt vorwiegend stattfindet. Es zeigte sich, dass dies vor allem in der endothelzellreichen Fraktion der Fall war. Aufgrund von nachhaltigen Problemen bei der semiquantitativen Western Blot Analyse wurde die Expression von Nampt in den Proben der Zellfraktionen lediglich auf mRNA-Ebene analysiert.

6.2.2.1 Charakterisierung der endothelzellreichen Zellfraktion

Zur Gewinnung der Zellfraktionen wurde ein Protokoll zur Kardiomyozyten-Isolierung nach Schlüter et al. verwendet⁷². Hierbei bleibt nach Isolierung der Kardiomyozyten eine Zellfraktion zurück, die kardiale Endothelzellen enthält. Es sind jedoch auch weitere Zellfraktionen enthalten, da die Endothelzellen nicht weiter aufgereinigt wurden. Es handelt sich hier vor allem um Leukozyten und Bindegewebszellen. Die Ergebnisse wurden daher stets als endothelzellreiche Zellfraktion deklariert und können nicht alleine auf die Gruppe der Endothelzellen alleine bezogen werden. Die weiteren Untersuchungen wurden unter Anderem deshalb mit kommerziell erhältlichen, aufgereinigten humanen Koronarendothelzellen durchgeführt.

6.2.2.2 Isolation von Leukozyten aus dem peripheren Blut von Mäusen

Da es nach Induktion eines Myokardinfarkts im Rahmen einer Entzündungsreaktion zu einer Einwanderung von Leukozyten in das Infarktareal kommt, sollte dieser Zellfraktion in der zellulären Differenzierung bei der Regulation von Nampt und miRNA-374 neben Kardiomyozyten und Endothelzellen ebenfalls Rechnung getragen werden. Da es aber schwierig ist, eingewanderte Leukozyten direkt aus dem Infarktareal zu isolieren, wurden als Näherung die Leukozyten aus dem peripheren venösen Blut nach Myokardinfarkt isoliert. Natürlich entspricht die Zusammensetzung der Leukozyten im peripheren Blutes nicht exakt derer, die in das Infarktareal einwandern, jedoch konnte so näherungsweise die verminderte Expression von Nampt sowie die vermehrte Expression von miRNA374 in der inhomogenen Gruppe der endothelzellreichen Zellfraktion weiter auf Endothelzellen eingegrenzt werden. (Abb. 23, 24)

Die Isolierung erfolgte mittels einer Dichtegradientenzentrifugation im Ficoll-Gradienten. Hierbei werden die mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten, Thrombozyten) aufgrund ihrer Dichte im Ficoll-Gradienten von anderen Blutzellen (Erythrozyten, Granulozyten) und toten Zellen getrennt. Bei dieser Methode wird jedoch lediglich der mononukleäre Anteil der Leukozyten des Blutes isoliert. Die Gruppe der Granulozyten, welche sicherlich einen bedeutenden Anteil der initial einwandernden Leukozyten in das Infarktareal ausmacht, wird hierbei keine Rechnung getragen.

Als Zeitpunkt der Isolierung der Zellfraktionen wurde 48 h post MI gewählt, da bekannt ist, dass zu diesem Zeitpunkt bereits eine deutliche Infiltration des Gebietes mit Leukozyten stattfindet. Des Weiteren verschiebt sich ab zwei Tagen nach Myokardinfarkt das Zellbild der einwandernden Entzündungszellen weg von den neutrophilen Granulozyten hin zu einer vermehrten Infiltration des Infarktareals mit Lymphozyten und Makrophagen¹⁰⁰.

6.2.2.3 Unterschiede in der Höhe der Regulation von Nampt

Es fällt auf, dass Nampt nach RNA-Isolierung aus dem gesamten Infarktareal deutlich stärker herunterreguliert ist (~0,6-fach), als dies in der endothelzellreichen Zellfraktion nach Isolierung der Kardiomyozyten der Fall war (~0,4-fach). Ein Grund hierfür könnte die unterschiedliche Behandlung des Gewebes vor der RNA-Isolierung sein. Bei der Gewinnung des Infarktareals wurde das Gewebe nach Perfusion mit physiologischer Kochsalzlösung sofort entnommen und bis zur RNA/miRNA-Isolierung bei -80°C gelagert. Bei der Isolierung der Kardiomyozyten wurden nach der Herzentnahme aus dem Thorax zunächst die Interzellulären Verbindungen (Integrine, Cadherine) mittels einer kalziumhaltigen Tyrode gelöst, anschließend erfolgte der Verdau des Gewebes mit einer Kollagenaselösung⁷². Damit waren die Zellen nach Isolierung deutlich mehr belastenden Einflüssen ausgesetzt, als die im intakten Infarktareal ohne Zellisolation.

6.3 Die Regulation von miRNA-374 nach Myokardinfarkt

Die Rolle von miRNAs als wichtige Regulatoren von Genen in diversen Organismen ist bereits mehrfach beschrieben worden. Sie scheinen bei diversen

Krankheiten in spezifischem Maße in ihrer Expression verändert zu sein, so dass ein „miRNA-Fingerabdruck“ für jede Krankheit zu existieren scheint^{49,54,55,101}. Die Beeinflussung ihrer Expression stellt somit einen attraktiven da sehr spezifischen Therapieansatz dar. Durch die organ- und zellspezifischen „fingerabdruckartigen“ Expressionsmuster von miRNAs besteht zudem die Möglichkeit einer sehr spezifischen Therapie mit denkbar geringerer Belastung des restlichen Organismus.

Daher wurde durch eine *in silico* Analyse der 3'UTR-Region der Nampt-mRNA und der dort enthaltenen Bindungsmotive versucht, potentiell bindende miRNAs zu identifizieren. Hierbei konnte miRNA-374 mittels dreier unterschiedlicher Algorithmen als potentiell Nampt-bindende mRNA identifiziert werden. Bereits die übereinstimmende Vorhersage durch zwei unabhängige Algorithmen (Suchmaschinen) hat in der Vergangenheit oft die korrekte Identifizierung von miRNA/RNA-Bindungen erlaubt^{102,103}. Daher schien es erfolgsversprechend, miRNA-374 aufgrund des stark positiven Vorhersagewertes weiter zu untersuchen und ihre potentielle Interaktion mit der Nampt-spezifischen mRNA zu verifizieren.

6.3.1 Signifikante Hochregulation von miRNA-374 nach Myokardinfarkt

Es zeigte sich, dass die miRNA-374 Expression 48 und 72 h nach Myokardinfarkt signifikant hochreguliert war. Nach 24 h kommt es allerdings zunächst zu einer signifikanten Herunterregulation von miRNA-374. Die Nampt-Expression war aber bereits nach 24 h signifikant reduziert, und dies kann somit nicht alleine auf die Beeinflussung durch die miRNA-374 zurückgeführt werden. Neben miRNAs gibt es noch andere Oligonukleotide, welche die Translation von Proteinen auf mRNA-Ebene beeinflussen. Hierzu zählen zum Beispiel siRNAs. Mature miRNAs ähneln strukturell siRNAs, jedoch binden siRNAs vollständig komplementär an ihre *target* mRNA, haben damit also stets eine Degradierung einer spezifischen mRNA zur Folge. Viele miRNAs zeigen jedoch, vor allem bei Säugetieren, eine imperfekte Komplementarität. Dies führt zum einen dazu, dass sie ihre *target* mRNA lediglich in der Translation inhibieren, was verminderte Proteinlevel, nicht jedoch eine Herunterregulation auf mRNA-Ebene be-

wirkt. Zum anderen ist hierdurch potentiell eine Beeinflussung von mehreren *targets* durch eine miRNA möglich⁵⁰.

Des Weiteren könnte eine verminderte Transkription aufgrund einer veränderten Aktivität der entsprechenden Transkriptionsfaktoren an der Herunterregulation von Namp1 beteiligt sein.

6.4 Hypoxie als Ursache der Expressionsänderungen von Namp1 und miRNA-374

6.4.1 Namp1 Herunterregulation durch Hypoxie

Die signifikante Herunterregulation von Namp1 auf mRNA-Ebene konnte ausschließlich nach dem Einfluss von 24 und 72 h Hypoxie bei einem Sauerstoffgehalt von 1 % detektiert werden (Abb. 26). Die Expressionsänderung nach 48 h war nicht signifikant; hier war die Streuung der Werte sehr groß. Möglicherweise wären die Ergebnisse aller Gruppen bei einer größeren Anzahl an Wiederholungen des Experiments durch eine potentiell geringere Streuung eindeutiger.

Hypoxie ist der Faktor, der beim Myokardinfarkt den größten Einfluss auf die Zellschädigung und Zelltod im Infarktareal entfaltet. Andererseits ist Hypoxie der bedeutendste Angiogenese *trigger* für Endothelzellen. Die Literatur ist hierzu uneinheitlich. Konträr zu diesen Ergebnissen steht die Studie von Bae et al. von 2006¹⁰⁴, in der eine Hochregulation von Namp1 unter dem Einfluss von 4, 8, 16 und 24 h Hypoxie ebenfalls bei einem O₂-Gehalt von 1 % beschrieben wird. Allerdings wurde in dieser Studie mit Krebs-Zelllinien gearbeitet, und die Ergebnisse sind daher nicht vollständig vergleichbar. Zum anderen wurden hier keine späteren Zeitpunkte nach Hypoxiebehandlung untersucht. Die Ergebnisse der Studie von Wang et al.⁹⁹ von 2011, in der erhöhte Namp1-Level nach Sauerstoff-Überdruckbehandlung beschrieben werden, lassen allerdings den Schluss zu, dass die vermehrte Expression von Namp1 vor allem unter Bedingungen mit vermehrtem und nicht vermindertem Sauerstoffangebot stattfindet.

Eine signifikante Hochregulation von Namp1 konnte zudem nach Wachstumsfaktor-Behandlung und durch inflammatorische Stimuli beobachtet werden. (Abb. 26).

6.4.2 Vermehrte Expression von miRNA-374 unter Hypoxie

Eine signifikante Hochregulation von miRNA-374, wie sie nach Myokardinfarkt beobachtet wurde, konnte *in vitro* ausschließlich nach der Hypoxie-Behandlung von 72 h detektiert werden. Auch *in vivo* erwies sich die Expression von miRNA-374 nach 72 h am größten. Nach 24 h kann *in vivo* wie auch *in vitro* zunächst eine signifikant reduzierte Expression von miRNA-374 detektiert werden. Es ist daher anzunehmen, dass eine Beeinflussung der Namp1 Expression durch miRNA-374 und damit der potentielle Einfluss auf die Angiogenese nach Myokardinfarkt erst zu diesem späteren Zeitpunkt stattfindet.

6.5 *In situ* Hybridisierung ohne signifikante Ergebnisse

Die *in-situ* Hybridisierung ist ein hochempfindliches und spezifisches Verfahren zum Nachweis einer gewebe- bzw. zellartspezifischen miRNA-mRNA Bindung (Hybridisierung) an kryokonservierten Gewebeschnitten (*in situ*). Es ist hiermit möglich die miRNA-RNA Bindung als solche nachzuweisen und des Weiteren zusätzlich, in welcher Zellart die miRNA dominierend exprimiert wird. In der vorliegenden Arbeit sollte die Bindung von miRNA-374 an die mRNA von Namp1 in Gewebeschnitten der Mäuseherzen nach Induktion eines Myokardinfarkts bzw. Herzen von kontrollierten Tieren gezeigt werden. Es sollte weiterhin gezeigt werden, in welcher Zellart innerhalb der Gewebeschnitte die miR-374 nach einem Myokardinfarkt dominierend exprimiert wird. Es konnte jedoch konnte auch nach mehrfacher Modifikation der experimentellen Bedingungen, wie unter anderem der Hybridisierungstemperatur, der Konzentration und Länge der Stringenz-Waschungen oder der Sondenkonzentration, keine spezifische Markierung von miRNAs erreicht werden. Eventuell müssen weitere Veränderungen an den Versuchsbedingungen vorgenommen werden, um ein deutliches Signal zu detektieren. Bei manchen Geweben scheint eine zu lange Fixierung in PFA zu schwächeren Signalen zu führen. Des Weiteren kann die Proteinase K Konzentration zu hoch oder zu niedrig gewesen sein. Der Proteinase K-Verdau erhöht die Permeabilität des Gewebes und damit die Effektivität der Hybridisierung, da die Sonde besser in das Gewebe eindringen kann. Eine zu lange Proteinase K Einwirkung oder zu hohe Proteinase K Konzentrationen zerstören

jedoch die Morphologie des Gewebes und führen wiederum zu schlechten Signalen. Auch die Temperatur der Stringenz-Waschungen ist kritisch. Bei zu hohen Temperaturen kann es zu schwachen Signalen kommen, während zu niedrige Temperaturen die Spezifität der Bindung reduzieren. Ein weiterer Grund für fehlende oder schwache Signale kann trotz aller Vorsicht und reinlichem kontaminationsarmen Arbeiten und Behandlung der Umgebung mit RNase-Inhibitoren eine RNase-Kontamination des Gewebes, der Versuchsaapparaturen oder der Umgebung darstellen¹⁰⁵.

6.6 Überexpression von miRNA-374

6.6.1 Regulation von Nampt nach miRNA-374 Überexpression

Um den Einfluss von miRNA-374 auf das Proliferations- und Migrationsverhalten von HCAECs sowie deren Angiogeneseigenschaften zu untersuchen, wurde zunächst eine Überexpression von miRNA-374 mit Hilfe eines spezifischen Precursor-Moleküls (pre-miRNA) durchgeführt. Hiermit wird die Situation *in vivo* nachgestellt, in der es zu einer signifikanten Hochregulation der miRNA-374 nach Myokardinfarkt kommt. Es zeigte sich, dass die Proteinexpression von Nampt unter dem Einfluss von miRNA-374 signifikant herunterreguliert war. Dies gab einen ersten Hinweis darauf, dass die *in silico* prognostizierte Bindung von miRNA-374 an ihr *target* Nampt *in vitro* in HCAECs nachvollzogen werden kann. Auf mRNA-Ebene konnte jedoch keine veränderte Nampt Expression detektiert werden. Es ist in der Literatur hinreichend belegt, dass durch die oft imperfekte Komplementarität von miRNA und 3'UTR-Region in eukaryotischen Zellen die betreffende mRNA häufig nicht degradiert, sondern lediglich in ihrer Translation inhibiert wird, was zu einer reduzierten Expression des entsprechenden Proteins führt⁵⁰.

6.6.2 Reduzierte Angiogeneseaktivität nach miRNA-374 Überexpression

Da der Einfluss von Nampt auf die Angiogeneseigenschaften von Endothelzellen bereits durch andere Arbeitsgruppen gezeigt wurde^{40,42,93}, sollte nun untersucht werden, ob über miRNA-374 ebenfalls Einfluss auf die Angiogenese genommen werden kann. Beim *tube formation* Assay zeigte sich

eine signifikant verminderte Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen durch HCAECs unter dem Einfluss von miRNA-374. Dabei fiel auf, dass die *tube formation* nicht nur signifikant reduziert, sondern fast vollständig aufgehoben war. Dies gibt einen deutlichen Hinweis auf eine möglicherweise erfolgreiche Beeinflussung der Angiogenese durch miRNA-374 über Nampt.

6.6.3 Kein Einfluss von miRNA-374 Überexpression auf Proliferation und Migration

Da Endothelzellen im Verlauf der Angiogenese Phasen von Proliferation, Migration und Differenzierung durchlaufen, wurden diese Eigenschaften der HCAECs unter den Bedingungen einer miRNA-374 Überexpression näher untersucht. Es sollte festgestellt werden, ob der Einfluss der miRNA-374 auf eine bestimmte Phase der Angiogenese eingegrenzt werden kann. Es konnten allerdings keine signifikanten Veränderungen bezüglich Zellzahl, Proliferation und Migration der HCAECs festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass andere Einflussfaktoren vorhanden sind, die die Vorgänge zur Ausbildung von Gefäßstrukturen von HCAECs beeinflussen.

Für die ungestörte Angiogenese sind *in vivo* neben Endothelzellen auch periendotheliale Komponenten / Zellen notwendig. Basalmembran und Perizyten sowie verschiedene steuernde Wachstumsfaktoren wie VEGF, PDGF-BB und Angiopoetin-1 greifen regulierend in die Vorgänge bei der Gefäßneubildung ein²⁰. Diese fehlen zum Teil unter experimentellen Bedingungen, was die vorliegenden Ergebnisse zumindest teilweise erklären könnte.

6.7 Knock-down von miRNA-374

6.7.1 Regulation der Nampt nach miRNA-374 knock-down

Um die Effekte der potentiellen Wechselwirkung von miRNA-374 und Nampt weiter zu untersuchen, wurde ein *knock-down* der miRNA durchgeführt. Dieser Versuch ist insbesondere wichtig hinsichtlich einer potentiellen, therapeutischen Beeinflussung der Nampt-Regulation und damit der Angiogenese nach Myokardinfarkt durch einen pharmakologischen Inhibitor. Nach miRNA-374 *knock-down* erwies sich Nampt auf Proteinebene als signifikant hochreguliert

(Abb. 34). Dies gibt einen weiteren Hinweis auf eine posttranskriptionelle Beeinflussung von Namp1 durch miRNA-374, vergleichbar mit den Ergebnissen der miRNA-374 Überexpression.

6.7.2 Fehlender Einfluss von miRNA-374 *knock-down* auf Proliferation, Migration und *tube formation*

Es zeigte sich allerdings, dass der *knock-down* der miRNA-374 unter basalen Bedingungen keinen signifikanten Einfluss auf Proliferation, Migration und *tube formation* hatte (Abb. 35 und 36). Eine Erklärung hierfür könnten zum Beispiel unpassende Versuchsbedingungen sein. Da eine Regulation von miRNA-374 und Namp1 vor allem unter dem Einfluss von 72 h Hypoxie gezeigt werden konnte, ein Faktor, der auch unter Infarktbedingungen am Herz eine entscheidende Rolle spielt, wurde der *knock-down* von miRNA-374 unter Hypoxie wiederholt.

6.8 *Knock-down* von miRNA-374 unter 72 h Hypoxie

6.8.1 Erhöhte anti-miRNA-374 Konzentration unter Hypoxiebedingungen

Es war unter Hypoxiebedingungen auffällig, dass hier für einen erfolgreichen *knock-down* von miRNA-374 eine höhere Konzentration des miRNA-Inhibitors (150 nM statt 100 nM unter Normoxie) notwendig war, um diesen erfolgreich durchführen zu können. Die Funktion von miRNAs kann durch verschiedene Transkriptionsfaktoren unter verschiedenen Bedingungen wie auch Hypoxie beeinflusst werden. So konnten u.a. die Transkriptionsfaktoren HIF, p53 und NF-κB als miRNA-Regulatoren unter Hypoxiebedingungen identifiziert werden¹⁰⁶. Dies könnte die Notwendigkeit einer höheren Konzentration des miRNA-Inhibitors in den Versuchen unter Hypoxie erklären.

6.8.2 Verminderte *tube formation* nach miRNA-374 *knock-down* unter Hypoxie

Die Fähigkeit der Endothelzellen kapilläre Verbindungen in Form von *tubes* auszubilden, war nach miRNA-374 *knock-down* unter 72 h Hypoxie im Gegensatz zu den Bedingungen unter Normoxie signifikant gesteigert (Abb. 38). Dies

gibt einen Hinweis darauf, dass Hypoxie ein grundlegender *trigger* nicht nur für die veränderte Expression von Nampt und miRNA-374, sondern auch in deren Folge für das Angiogeneseverhalten von Endothelzellen nach Myokardinfarkt darstellt.

6.9 Nampt *knock-down*

Der *knock-down* von Nampt wurde durchgeführt, um dessen Effekte auf Viabilität, Proliferation, Migration und Angiogeneseigenschaften von HCAECs unter den Bedingungen einer verminderten Nampt-Expression, vergleichbar wie in der Situation nach Myokardinfarkt, zu untersuchen. Die Transfektion der Zellen mit der Nampt-spezifischen siRNA führte in HCAEC zu einer signifikant gesteigerten Proliferation, jedoch nicht zu einer gesteigerten Migrationsfähigkeit der Zellen. Auch die Fähigkeit der Endothelzellen kapilläre Sprosse auszubilden war nicht verändert im Vergleich mit der Kontrolle. Allerdings wurde der *knock-down* bisher noch nicht unter Hypoxiebedingungen wiederholt. Dies wäre aber, analog wie bei den Untersuchungen mit dem miRNA-Inhibitor, eine zur *in vivo* Situation vergleichbarere Versuchsbedingung.

6.9.1 Keine Bindung von Nampt und miRNA-374 im Luciferase Assay nachweisbar

Nachdem die funktionellen Effekte einer Beeinflussung von miRNA-374 auf die Nampt-Expression und das Angiogeneseverhalten von Endothelzellen untersucht wurden, sollte nun in einem nächsten Schritt die Bindung von miRNA-374 an die 3'UTR ihrer potentiellen *target* mRNA Nampt validiert werden. Es konnte allerdings wiederholt kein signifikanter Unterschied in der Lumineszenz der Proben detektiert werden. Dies kann zum einen an für den Assay ungünstigen Versuchsbedingungen liegen. Eine erfolgreiche Transfektion ist grundlegend abhängig von gesunden, vitalen Zellen, da sonst eine erfolgreiche Inkorporation der gewünschten DNA/RNA/miRNA nicht in genügendem Maße stattfinden kann. Für die Versuche wurden Zellen in verschiedenen Passagen (P3 bis P9) verwendet. Es ist möglich, dass Zellen in höheren oder sehr niedrigen Passagen empfindlicher auf belastende Bedingungen während einer Transfektion reagieren. Daher wurde ein endotoxinfreies Kit zur Plasmidisolierung verwendet.

Zum anderen ist auch ein funktionierendes Plasmid-Konstrukt essentiell für eine erfolgreiche Versuchsdurchführung. Der Nampt- sowie der Kontrollvektor wurden als gebrauchsfertige Konstrukte von der Firma SwitchGear Genomics bezogen. Die Validierung ihrer Basensequenz bzw. Funktion wurde vor den Versuchen nicht gesondert kontrolliert. Transfektionsreagenzien können sich untereinander negativ beeinflussen, was zu einer verminderten Vitalität der Zellen oder einem schlechteren Transfektionserfolg führen kann. Das Protokoll für die Transfektion ist in unserer Arbeitsgruppe allerdings bereits gut etabliert, und es wurden keine signifikanten toxischen Effekte beobachtet.

Der Nachweis einer direkten Bindung von miRNA-374 an Nampt-mRNA konnte somit noch nicht erbracht werden und ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

6.10 SIRT1 – ein potentielles *down-stream target* von Nampt

Nampt spielt eine wichtige Rolle in der Biosynthese von NAD^+ bei Säugetieren^{33,34}. Verschiedene Enzyme sind wiederum für die von ihnen katalysierten Reaktionen grundlegend abhängig von NAD^+ als Kofaktor. Zu ihnen gehören die Sirtuine⁵⁷. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Nampt durch die Bereitstellung von NAD^+ maßgeblich an der Regulation der SIRT1 Aktivität beteiligt ist (Abb. 5)⁶⁵. Verschiedene Gruppen haben des Weiteren bereits im Zusammenhang mit Myokardinfarkt und Angiogenese protektive Eigenschaften von SIRT1 gezeigt^{33,61-63}. Bislang sind allerdings keine ausführlicheren Untersuchungen der Expression und Aktivität von SIRT1 nach Myokardinfarkt beschrieben. Als potentielles *down-stream target* von Nampt sollte dies im Rahmen dieses Projektes näher untersucht werden.

6.10.1 SIRT1 signifikant herunterreguliert, SIRT1-Aktivität zeitabhängig reduziert nach Myokardinfarkt

Es zeigte sich, dass SIRT1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt signifikant herunterreguliert war. Auch die Aktivität von SIRT1 war zeitabhängig signifikant reduziert (Abb. 42 und 43). Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass Nampt über die Bereitstellung von NAD^+ direkten Einfluss auf die SIRT1-Aktivität ausübt^{34,107,108}. Sollte die Expression von Nampt also über

miRNA-374 zu beeinflussen sein, könnte dies auch die Aktivität von SIRT1 im Herz potentiell erhöhen. Es ist unklar, ob die NAD^+ -Bereitstellung für eine gesteigerte SIRT1-Aktivität alleine ausreichte, da nicht nur die Aktivität von SIRT1, sondern auch dessen mRNA- und Proteinexpression nach Myokardinfarkt reduziert waren. Es ist jedoch möglich, dass bereits eine Steigerung der Aktivität der vorhandenen Proteinmenge ausreichte, um einen Schutzeffekt im Bereich des Myokards zu generieren. Ramsey et al. sowie Nakahata et al. haben 2009 bereits eine interessante Interaktion von SIRT1 und Nampt beschrieben. Demnach zeigt die NAD^+ -Produktion von Nampt eine zirkadiane Rhythmik, die von der *core* CLOCK-Maschinerie reguliert zu werden scheint^{109,110}. Eine Inhibition von Nampt und damit verbunden niedrige NAD^+ -Level bewirkte hier eine Oszillation des CLOCK-Gens *Period2* (*Per2*). Dies geschieht durch die Freigabe des CLOCK:BMAL1-Komplexes durch SIRT1 - die Transkription von *Per2* wird aktiviert. SIRT1 wiederum bewirkt, gebunden an den Promotor von Nampt, eine Komplexbildung mit CLOCK:BMAL1. Dies wiederum führt zur vermehrten Synthese von Nampt und stellt eine Art *feedback loop* dar, durch den Nampt/ NAD und SIRT1/CLOCK:BMAL1 interagieren und sich gegenseitig beeinflussen (Abb. 44)^{109,110}.

Die zirkadiane Rhythmik der Nampt-Expression wurde bei den Versuchen dieser Arbeit nicht berücksichtigt, kann jedoch einen Einfluss auf die Ergebnisse gehabt haben. Die Proben dieser Arbeit wurden zwar zu unterschiedlichen Tageszeiten entnommen, lieferten jeweils jedoch vergleichbare Ergebnisse, weswegen die zirkadiane Rhythmik der Nampt-Expression bei den vorliegenden Bedingungen des Myokardinfarktes keine zu große Rolle zu spielen scheint. Ein anderer Einflussfaktor auf die SIRT1-Expression und -Aktivität ist durch Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) beschrieben worden. PARP-1 wird unter anderem durch oxidativen Stress aktiviert und wirkt proapoptotisch. PARP-1 ist, wie SIRT1, in seiner Aktivität ebenfalls grundlegend abhängig vom Kofaktor NAD^+ . Gesteigerte PARP-1-Aktivität führte in einer Studie von Pillai et al. zu vermindertem NAD^+ -Level in Kardiomyozyten *in vitro*. In der Folge wurde eine reduzierte SIRT1-Aktivität festgestellt. Wurde allerdings die zelluläre NAD^+ -Konzentration mittels NAD^+ -Zugabe oder Nampt-Überexpression erhöht, so konnte ein Absterben der Kardiomyozyten verhindert werden. Des Weiteren war

dieser Effekt abhängig von SIRT1. So konnte die Schutzwirkung von NAD^+ unter einem SIRT1 *knock-down* trotz NAD^+ -Zugabe zum Medium nicht beobachtet werden¹¹¹.

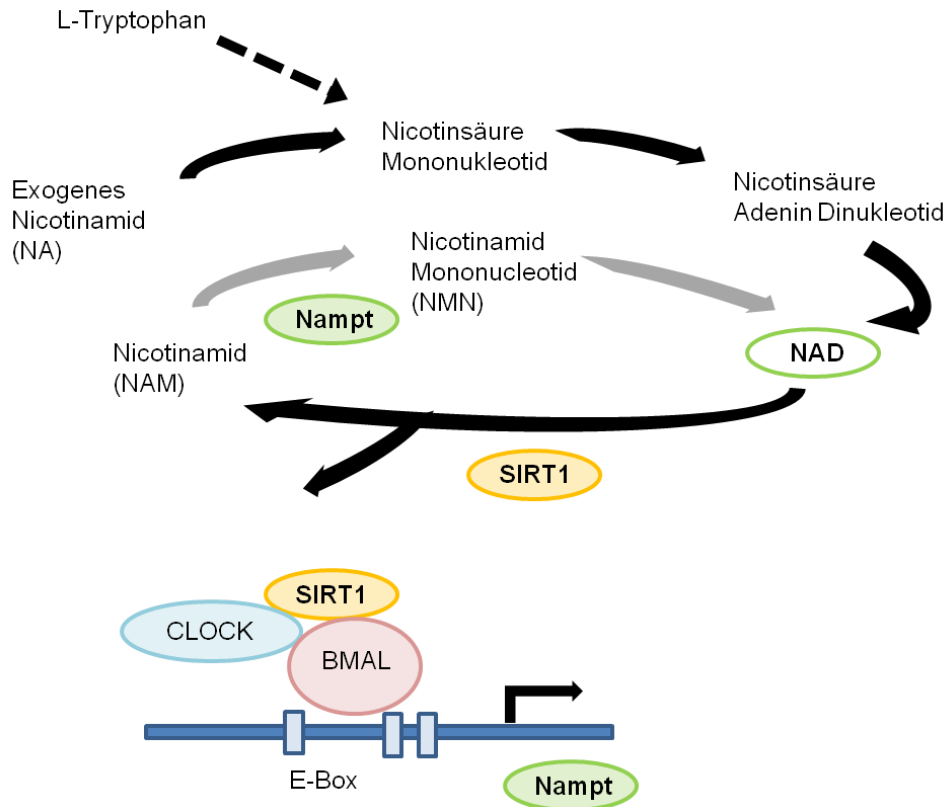


Abbildung 46: *Nampt-SIRT1 feedback-loop nach Nakahata et al¹¹⁰.*

Dies kann eine Erklärung für die festgestellte erniedrigte SIRT1-Aktivität nach Myokardinfarkt darstellen. Somit würde PARP-1 das vorhandene NAD^+ im Infarktareal konsumieren, so dass es für die Aktivität von SIRT1 nicht mehr zur Verfügung steht. Die PARP-1-Expression und -Aktivität wurden in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht. Es kann also durch die vorliegende Arbeit mit miR-NA-374 ein weiterer möglicher Faktor zur Beeinflussung zum einen der Nampt-Aktivität, aber hierdurch auch der SIRT1-Aktivität vorgestellt werden. In deren Folge könnte eine regenerative Angiogenese im Bereich des Infarktareals durch Nampt und SIRT1 gefördert und die zurückbleibende Infarktnarbe damit verkleinert werden.

6.11 **Ausblick**

Im Folgenden wäre es nun interessant, die miRNA-374 als potentiell therapeutisches *target in vivo* näher zu untersuchen. Um den Einfluss von miRNAs *in vivo* im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen näher zu untersuchen, wurden in der Literatur bereits verschiedene miRNA-Inhibitoren bei Mäusen erfolgreich eingesetzt^{112,113}. Nach Induktion eines Myokardinfarktes kann nachfolgend der miRNA-Inhibitor verabreicht und der Effekt auf die Infarktgröße sowie die Pumpfunktion des Herzens genauer untersucht werden. Auch hinsichtlich einer Förderung von Angiogenese durch miRNA-374 wäre ein Einsatz des miRNA-Inhibitors im Hinterlauf-Ischämie-Modell von Interesse. Diese Untersuchungen sind aktuell Gegenstand weiterer Untersuchungen der Arbeitsgruppe.

7 Zusammenfassung

7.1 Zusammenfassung

Das Protein Nampt wurde in der Literatur bereits mehrfach als protektiver Einflussfaktor im Zusammenhang mit dem Schutz vor Apoptose von Kardiomyozyten sowie der Förderung von Angiogenese von Endothelzellen beschrieben. Auch *in vivo* konnte eine Verkleinerung der Infarktfläche nach Induktion eines Myokardinfarktes bzw. I/R unter dem Einfluss von Nampt gezeigt werden. Es scheint des Weiteren über die Bereitstellung von NAD⁺ in Stress-Situationen einen Einfluss auf die Aktivität der Deacetylase SIRT1 zu entfalten. Ein neuerer Ansatz zu Beeinflussung von mRNA- und Proteinexpression stellen miRNAs dar, die ihre *target* mRNA degradieren bzw. in der Translation inhibieren. Durch *in silico* Analysen konnte miRNA 374 als potentieller Regulator der Nampt-spezifischen mRNA- und -Proteinexpression identifiziert werden. In diesem Projekt wurde daher die Möglichkeit einer Einflussnahme auf die Expression von Nampt nach Myokardinfarkt durch miRNA-374 näher untersucht.

Hierfür wurde bei C57Bl6-Mäusen ein experimenteller Myokardinfarkt über die Ligatur der LAD induziert und nachfolgend zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48 und 72 h) die Expressionsrate von Nampt sowie von miRNA-374 bestimmt. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass es auch zu späteren Zeitpunkten nach Myokardinfarkt *in vivo* zu einer signifikanten Herunterregulation von Nampt sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene kommt. Diese Herunterregulation konnte vornehmlich in der endothelzellreichen Zellfraktion im Herzen nachgewiesen werden. Als beeinflussender Faktor dieser verminderten Expression *in vitro* konnte Hypoxie ermittelt werden. Im Gegensatz zu der beschriebenen Expression von Nampt nach Myokardinfarkt kam es zu den genannten Zeitpunkten zu einer signifikanten Hochregulierung der miRNA-374. Dies konnte erneut vor allem in endothelzellreichen Zellfraktion detektiert werden. Der beeinflussende Faktor der Hochregulation von miRNA-374 *in vitro* war erneut eine Behandlung der Zellen mit Hypoxie.

Eine nachfolgend durchgeführte Überexpression von miRNA-374 führte zu einer verminderten Proteinexpression von Nampt. Des Weiteren erwies sich die angiogene Eigenschaft von Endothelzellen, Gefäßsprosse zu bilden, unter die-

sen Bedingungen als signifikant reduziert. Ein *knock-down* von miRNA-374 führte zu einer Hochregulation von Nampt, hatte allerdings keinen signifikanten Einfluss auf die angiogenen Eigenschaften von Endothelzellen. Im Gegensatz hierzu konnte unter dem Einfluss von Hypoxie nach miRNA-374 *knock-down* eine gesteigerte *tube formation* der Endothelzellen detektiert werden.

Neben der Beeinflussung von Nampt durch miRNA-374, der damit verbundenen Möglichkeit der Förderung von Angiogenese und somit des Regenerationspotentials des durch Myokardinfarkt geschädigten Myokards wurde SIRT1 als ein potentielles *target* Molekül von Nampt näher charakterisiert. Auch SIRT1 erwies sich zu verschiedenen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene als signifikant herunterreguliert, seine Aktivität als signifikant reduziert. Durch die Abhängigkeit der Deacetylierungsreaktion von SIRT1 von NAD⁺ als wichtigem Kofaktor kann Nampt durch eine vermehrte NAD⁺-Bereitstellung Einfluss auf die SIRT1-Aktivität ausüben. Eine vermehrte Nampt-Expression durch Inhibierung der miRNA-374 kann somit nicht nur direkt, sondern auch über eine Beeinflussung der SIRT1-Aktivität protektiv wirken.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich durch die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit eine Möglichkeit gefunden hat, über die Inhibierung von miRNA-374 nach Myokardinfarkt die Expression von Nampt zu beeinflussen und somit zu einer Förderung der Angiogenese im Infarktareal und in der Folge einer verbesserten Regenerationsfähigkeit des Myokards beizutragen. Es ist nun weiterhin von Interesse, einen therapeutischen Effekt auf eine Gefäßneubildung im infarzierten Myokardareal und hiermit verbunden eine potentiell verbesserte Pumpfunktion durch die Inhibierung von miRNA-374 *in vivo* weitergehend zu untersuchen.

7.2 Summary

The Protein Nampt functions in a wide array of cellular processes, including protection from apoptosis in cardiac myocytes. Furthermore an intravenous injection of Nampt has been shown to result in a smaller area of myocardial infarction after I/R *in vivo*. Nampt also seems to be critical for angiogenic activity in endothelial cells. And in addition it seems to influence the activity of the deacetylase SIRT1 by providing NAD⁺ in stress situations. MiRNAs represent a new possibility to influence mRNA and protein expression either by degrading their target mRNA or inhibiting its translation.

Therefore, in this project the influence of miRNA-374 on Nampt expression and the angiogenic activity of endothelial cells after myocardial infarction has been investigated. In a first step, myocardial infarction was induced by ligating the left coronary artery (LAD) of C57/Bl6 mice. Mice were euthanized and the ischemic myocardium was dissected for further evaluation 24, 48 and 72 h after myocardial infarction. At all time points, Nampt was significantly down-regulated at both the mRNA and protein level, and it could be verified, that this down-regulation primarily took place in the endothelial-enriched cell fraction isolated from the ischemic hearts. In a next step it has been investigated, which factor might cause the down-regulation of Nampt in human coronary artery endothelial cells (HCAEC) *in vitro*, and hypoxia was identified as the main trigger for Nampt-down-regulation. MiRNA-374 was identified to regulate Nampt at a post-transcriptional level as a possible explanation for the decreased Nampt concentration and activity. In addition, miRNA-374 proved to be significantly up-regulated after myocardial infarction *in vivo* and after hypoxic treatment *in vitro*.

The overexpression of miRNA-374 in ECs led to a significant down-regulation of Nampt protein expression *in vitro*. Tube formation of ECs was significantly reduced after miRNA-374 overexpression as a sign of reduced angiogenic activity of these cells. A knock-down of miR-374 by a specific o-methylated miRNA-inhibitor *in vitro* resulted in an up-regulation of Nampt levels in ECs. However, tube formation was not affected under these conditions. In contrast, after repeating the experiment under hypoxic conditions, tube formation activity of ECs was significantly increased after the knock-down of miRNA-374.

Subsequently, SIRT1 expression - as a putative target molecule of Nampt - has been elucidated after myocardial infarction. SIRT1 mRNA- and protein expression were significantly down-regulated and its activity significantly reduced after myocardial infarction *in vivo*. Because SIRT1 deacetylation activity is dependent of the availability of NAD⁺, Nampt is also able to influence the protective effects of SIRT1 by providing enough NAD⁺ for its action. These findings point out another possibility to protect the heart from ischemic damage.

In summary, miRNA-374 was identified as a key regulator of Nampt, which itself regulates angiogenesis and has the potential for myocardial regeneration following myocardial infarction. Further studies, however, are needed to determine the role of miRNA-374 *in vivo* and whether its inhibition might increase the angiogenic activity and the regenerative potential of endothelial cells in the infarcted myocardium.

8 Abbildungsverzeichnis

<u>ABBILDUNG 1:</u> VORGÄNGE BEI DER ATHEROSKLEROSE (AUS DZAU ET AL.; NAT MED.; 2002)	9
<u>ABBILDUNG 2:</u> VORGÄNGE BEI DER ANGIOGENESE (AUS: BERGERS ET AL.; NAT REV CANCER; 2003)	13
<u>ABBILDUNG 3:</u> MIRNA-SYNTHESE UND FUNKTION (AUS: LIU ET AL.; INT J MOL SCI.; 2008)	19
<u>ABBILDUNG 4:</u> DEACETYLIERUNGSREAKTION DURCH SIRT1 (MODIFIZIERT NACH MICHAN ET AL.; BIOCHEM J.; 2007)	21
<u>ABBILDUNG 5:</u> ÜBERSICHT ZU DEN NICOTINAMID-ADENIN-DINUCLEOTID (NAD ⁺) SYNTHESWEGEN (MODIFIZIERT NACH SAUVE ET AL.; ANNU REV BIOCHEM.; 2006)	23
<u>ABBILDUNG 6:</u> HÖHE DER LIGATUR DES RAMUS INTERVENTRICULARIS ANTERIOR DER ARTERIA CORO-NARIA SINISTRA (LAD)	33
<u>ABBILDUNG 7:</u> LAGERUNG ZUR INTUBATION	34
<u>ABBILDUNG 8:</u> LAGERUNG DER MAUS FÜR DIE EKG-ABLEITUNG	36
<u>ABBILDUNG 9:</u> OPERATIONSSITUS, BLICK AUF DAS HERZ	36
<u>ABBILDUNG 10:</u> DAS ELEKTROKARDIOGRAMM (EKG) EINER MAUS VOR (A) UND ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN NACH MYOKARDINFARKT (B-D)	38
<u>ABBILDUNG 11:</u> KANÜLIERUNG DER ABDOMINALEN V. CAVA ZUR BLUTENTNAHME	40
<u>ABBILDUNG 12:</u> PLATZIEREN DER KANÜLE IN DIE AORTA DESCENDENS ZUR RETROGRADEN FÄRBUNG DES KREISLAUFS UND DAMIT DES HERZENS MIT EVANS BLUE (FARBSTOFF) ZUR NEGATIVDARSTELLUNG DES KARDIALEN INFARKTAREALS	40
<u>ABBILDUNG 13:</u> RETROGRADE PERFUSION DES KREISLAUFSYSTEMS MIT EVANS BLUE FARBSTOFF ZUR DARSTELLUNG DES KARDIALEN INFARKTAREALS NACH LAD-LIGATUR	41
<u>ABBILDUNG 14:</u> HERZ GEFÄRBT MIT SYSTEMISCH APPLIZIERTEM EVANS BLUE FARBSTOFF	41

9 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: PRIMÄR-ANTIKÖRPER FÜR WESTERN BLOT ANALYSE SPEZIFISCHER PROTEINE	43
TABELLE 2: SEKUNDÄR-ANTIKÖRPER FÜR WESTERN BLOT	43
TABELLE 3: PRIMER FÜR REAL-TIME PCR (FOR = FORWARD; REV = REVERSE)	54
TABELLE 4: MIRNA-PRIMER FÜR REAL-TIME PCR	55
TABELLE 5: SEQUENZEN DER NAMPT-SPEZIFISCHEN UND DER KONTROLL- SIRNAS	63
TABELLE 6: ERGEBNISSE DER IN SILICO ANALYSE DER MIRNAS, DIE NAMPT BEEINFLUSSEN, AUS DER INTERAKTIVEN ONLINE DATENBANK DER UNIVERSITÄT HEIDELBERG (HTTP://WWW.UMM. UNI- HEIDELBERG.DE/APPS/ZMF/MIRWALK/PREDICTEDMIRNAGENE.PHP)	77

10 Literaturverzeichnis

1. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*. 1999; 353(9164): 1547-1557.
2. Wiesner G, Grimm J, Bittner E. Incidence of myocardial infarct in Germany: prevalence, incidence trends, East-West comparison. *Gesundheitswesen*. 1999; 61 Spec No: S72-S78.
3. Schmailzl KJ, Holschermann F, Schwalm T, Wilke E. Acute coronary syndrome: ST-segment elevation infarct. *Wien Med Wochenschr*. 2003; 153(19-20): 434-449.
4. Gohlke H. Primary prevention of coronary artery disease : Is there a role for risk scores?. *Herz*. 2012; 37(1): 75-80
5. Myocardial infarction redefined - a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the re-definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2000; 21(18): 1502-1513.
6. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 2005; 111(25): 3481-3488.
7. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:791-804.
8. Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart*. 2000; 83(3): 361-366.
9. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995; 92(3): 657-671.
10. Ferreira R. The reduction of infarct size--forty years of research--second of two parts. *Rev Port Cardiol*. 2010; 29(7-8): 1219-1244.
11. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2002; 8(11): 1249-1256.
12. Roy S, Khanna S, Bickerstaff AA, Subramanian SV, Atalay M, Bierl M, Pendyala S, Levy D, Sharma N, Venojarvi M, Strauch A, Orosz CG, Sen CK. Oxygen sensing by primary cardiac fibroblasts: a key role of p21(Waf1/Cip1/Sdi1). *Circ Res*. 2003; 92(3): 264-271.
13. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest*. 2005; 115(3): 500-508.
14. Slezak J, Tribulova N, Okruhlicova L, Dhingra R, Bajaj A, Freed D, Singal P. Hibernating myocardium: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009; 87(4): 252-265.
15. Ertl G, Frantz S. Wound model of myocardial infarction. *Am J Physiol*. 2005; 288(3): H981-H983.
16. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev*. 1999; 79(2): 609-634.
17. Seiler C. The human coronary collateral circulation. *Eur J Clin Invest*. 2010; 40(5):465-476.
18. Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics*. 2004; 16(3): 349-360.
19. Salto-Tellez M, Yung Lim S, El-Oakley RM, Tang TP, ZA AL, Lim SK. Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse: a quantifiable and highly reproducible experimental model. *Cardiovasc Pathol*. 2004; 13(2): 91-97.

20. Kutryk MJ, Stewart DJ. Angiogenesis of the heart. *Microsc Res Tech.* 2003; 60(2): 138-158.
21. Mingliang R, Bo Z, Zhengguo W. Stem cells for cardiac repair: status, mechanisms, and new strategies. *Stem Cells Int.* 2011: 310928.
22. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005; 438(7070): 932-936.
23. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003; 9(6): 653-660.
24. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(6): 401-410.
25. Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(2): 237-268.
26. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995; 1(1): 27-31.
27. Hashimoto E, Ogita T, Nakaoka T, Matsuoka R, Takao A, Kira Y. Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol.* 1994; 267(5 Pt 2): H1948-H1954.
28. Ladoux A, Frelin C. Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 195(2): 1005-1010.
29. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med.* 2000; 342(9): 626-633.
30. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Boersma E, Zeiher AM, Simoons ML. Prognostic significance of angiogenic growth factor serum levels in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003; 107(4): 524-530.
31. Helisch A, Schaper W. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation.* 2003; 10(1): 83-97.
32. Zhang LQ, Heruth DP, Ye SQ. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Human Diseases. *J Bioanal Biomed.* 3: 13-25.
33. Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, Boeke JD. The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem.* 2006; 75: 435-465.
34. Revollo JR, Grimm AA, Imai S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2004; 279(49): 50754-50763.
35. Jia SH, Li Y, Parodo J, Kapus A, Fan L, Rotstein OD, Marshall JC. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J Clin Invest.* 2004; 113(9): 1318-1327.
36. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science.* 2005; 307(5708): 426-430.
37. Hsu CP, Oka S, Shao D, Hariharan N, Sadoshima J. Nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates cell survival through NAD⁺ synthesis in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2009; 105(5): 481-491.
38. Lim SY, Davidson SM, Paramanathan AJ, Smith CC, Yellon DM, Hausenloy DJ. The novel adipocytokine visfatin exerts direct cardioprotective effects. *J Cell Mol Med.* 2008; 12(4): 1395-1403.
39. Hausenloy DJ, Duchon MR, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2003; 60(3): 617-625.

40. Kim SR, Bae SK, Choi KS, Park SY, Jun HO, Lee JY, Jang HO, Yun I, Yoon KH, Kim YJ, Yoo MA, Kim KW, Bae MK. Visfatin promotes angiogenesis by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 357(1): 150-156.
41. Adya R, Tan BK, Chen J, Randeva HS. Pre-B cell colony enhancing factor (PBEF)/visfatin induces secretion of MCP-1 in human endothelial cells: role in visfatin-induced angiogenesis. *Atherosclerosis.* 2009; 205(1): 113-119.
42. Lovren F, Pan Y, Shukla PC, Quan A, Teoh H, Szmítko PE, Peterson MD, Gupta M, Al-Omran M, Verma S. Visfatin activates eNOS via Akt and MAP kinases and improves endothelial cell function and angiogenesis in vitro and in vivo: translational implications for atherosclerosis. *Am J Physiol.* 2009; 296(6): E1440-E1449.
43. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.* 2005; 433(7027): 769-773.
44. Latronico MV, Condorelli G. MicroRNAs and cardiac pathology. *Nat Rev Cardiol.* 2009; 6(6): 419-429.
45. Liu Z, Sall A, Yang D. MicroRNA: An emerging therapeutic target and intervention tool. *Int J Mol Sci.* 2008; 9(6): 978-999.
46. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004; 14(10A): 1902-1910.
47. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell.* 2007; 27(1): 91-105.
48. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2002; 21(17): 4663-4670.
49. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116(2): 281-297.
50. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol.* 2007; 17(3): 118-126.
51. Murray BS, Choe SE, Woods M, Ryan TE, Liu W. An in silico analysis of microRNAs: mining the miRNAome. *Mol Biosyst.* 2010; 6(10): 1853-1862.
52. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, Chavakis E, Potente M, Tjwa M, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science.* 2009; 324(5935): 1710-1713.
53. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell.* 2003; 115(7): 787-798.
54. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004; 431(7006): 350-355.
55. Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, Golub TR, Pieske B, Pu WT. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics.* 2007; 31(3): 367-373.
56. van Rooij E, Olson EN. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest.* 2007; 117(9): 2369-2376.
57. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J.* 2007; 404(1): 1-13.
58. Shoba B, Lwin ZM, Ling LS, Bay BH, Yip GW, Kumar SD. Function of sirtuins in biological tissues. *Anat Rec (Hoboken).* 2009; 292(4): 536-543.
59. Cheng HL, Mostoslavsky R, Saito S, Manis JP, Gu Y, Patel P, Bronson R, Appella E, Alt FW, Chua KF. Developmental defects and p53 hyperacetylation

- in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(19): 10794-10799.
60. Hsu CP, Zhai P, Yamamoto T, Maejima Y, Matsushima S, Hariharan N, Shao D, Takagi H, Oka S, Sadoshima J. Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion. *Circulation*. 2010; 122(21): 2170-2182.
 61. Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X, Tian B, Wagner T, Vatner SF, Sadoshima J. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res*. 2007; 100(10): 1512-1521.
 62. Alcendor RR, Kirshenbaum LA, Imai S, Vatner SF, Sadoshima J. Silent information regulator 2alpha, a longevity factor and class III histone deacetylase, is an essential endogenous apoptosis inhibitor in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2004; 95(10): 971-980.
 63. Potente M, Ghaeni L, Baldessari D, Mostoslavsky R, Rossig L, Dequiedt F, Haendeler J, Mione M, Dejana E, Alt FW, Zeiher AM, Dimmeler S. SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev*. 2007; 21(20): 2644-2658.
 64. Potente M, Dimmeler S. Emerging roles of SIRT1 in vascular endothelial homeostasis. *Cell Cycle*. 2008; 7(14): 2117-2122.
 65. Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol*. 2008; 7(14): 2117-2122.
 66. Scherrer-Crosbie M, Rodrigues AC, Hataishi R, Picard MH. Infarct size assessment in mice. *Echocardiography*. 2007; 24(1): 90-96.
 67. Degabriele NM, Griesenbach U, Sato K, Post MJ, Zhu J, Williams J, Jeffery PK, Geddes DM, Alton EW. Critical appraisal of the mouse model of myocardial infarction. *Exp Physiol*. 2004; 89(4): 497-505.
 68. Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, Pandian NG, Hanak GG, Smith JJ, Mendelsohn ME, Konstam MA. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1998; 274(5 Pt 2): H1812-1820.
 69. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol*. 1995; 269(6 Pt 2): H2147-H2154.
 70. Wehrens XH, Kirchhoff S, Doevendans PA. Mouse electrocardiography: an interval of thirty years. *Cardiovasc Res*. 2000; 45(1): 231-237.
 71. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1): 265-275.
 72. Schluter KD, Schreiber D. Adult ventricular cardiomyocytes: isolation and culture. *Methods Mol Biol*. 2005; 290: 305-314.
 73. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006; 1(3): 1559-1582.
 74. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*. 2002; 29(1): 23-39.
 75. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008; 3(6): 1101-1108.
 76. McKinnon. Hematopoietic stem / progenitor cells and placental vascular development : in vitro study on the role of oxygen and stromal-derived factor-1alpha in the establishment of a stem cell niche. 2007; <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2007/4708/index.html>.
 77. Stewart EA, Nowak RA. Leiomyoma-related bleeding: a classic hypothesis updated for the molecular era. *Hum Reprod Update*. 1996; 2(4): 295-306.
 78. Obernosterer G, Martinez J, Alenius M. Locked nucleic acid-based in situ detection of microRNAs in mouse tissue sections. *Nat Protoc*. 2007; 2(6): 1508-1514.
 79. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*. 2003; 9(6): 677-684.

80. Doevendans PA, Daemen MJ, de Muinck ED, Smits JF. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res.* 1998; 39(1): 34-49.
81. Weber KT. Infarcted hearts of mice and men. *Cardiovasc Res.* 1999; 41(3):506-508.
82. Munz MR, Faria MA, Monteiro JR, Aguas AP, Amorim MJ. Surgical porcine myocardial infarction model through permanent coronary occlusion. *Comp Med.* 2011; 61(5):445-452.
83. Liu SK, Tilley LP, Tappe JP, Fox PR. Clinical and pathologic findings in dogs with atherosclerosis: 21 cases (1970-1983). *J Am Vet Med Assoc.* 1986; 189(2): 227-232.
84. DePalma RG, Koletsky S, Bellon EM, Insull W, Jr. Failure of regression of atherosclerosis in dogs with moderate cholesterolemia. *Atherosclerosis.* 1977; 27(3): 297-310.
85. Patterson JS, Rusley MS, Zachary JF. Neurologic manifestations of cerebrovascular atherosclerosis associated with primary hypothyroidism in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1985; 186(5): 499-503.
86. Sottiaux J. Atherosclerosis in a dog with diabetes mellitus. *J Small Anim Pract.* 1999; 40(12): 581-584.
87. Krieg K. Vorkommen und Morphologie der spontanen Arteriosklerose bei Haus- und Wildschweinen. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A.* 1968; 15(5): 388-400.
88. E. Dahme EW. *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere.* Vol 6. Stuttgart: Enke Verlag; 2007.
89. Driehuys S, Van Winkle TJ, Sammarco CD, Drobatz KJ. Myocardial infarction in dogs and cats: 37 cases (1985-1994). *J Am Vet Med Assoc.* 1998; 213(10): 1444-1448.
90. Falk T, Jonsson L. Ischaemic heart disease in the dog: a review of 65 cases. *J Small Anim Pract.* 2000; 41(3): 97-103.
91. Fozzard HA. Validity of myocardial infarction models. *Circulation.* 1975; 52(6 Suppl): III131-146.
92. Schaper W, Winkler B. Of mice and men - the future of cardiovascular research in the molecular era. *Cardiovasc Res.* 1998; 39(1): 3-7.
93. Adya R, Tan BK, Punj A, Chen J, Randeva HS. Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signalling pathways: novel insights into visfatin-induced angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 2008; 78(2): 356-365.
94. Rongvaux A, Shea RJ, Mulks MH, Gigot D, Urbain J, Leo O, Andris F. Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *Eur J Immunol.* 2002; 32(11): 3225-3234.
95. Wilting RH, Yanover E, Heideman MR, Jacobs H, Horner J, van der Torre J, DePinho RA, Dannenberg JH. Overlapping functions of Hdac1 and Hdac2 in cell cycle regulation and haematopoiesis. *EMBO J.* 2010; 29(15): 2586-2597.
96. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.* 2002; 296(5567): 550-553.
97. Roovers K, Davey G, Zhu X, Bottazzi ME, Assoian RK. Alpha5beta1 integrin controls cyclin D1 expression by sustaining mitogen-activated protein kinase activity in growth factor-treated cells. *Mol Biol Cell.* 1999; 10(10): 3197-3204.
98. Anders L, Ke N, Hydbring P, Choi YJ, Widlund HR, Chick JM, Zhai H, Vidal M, Gygi SP, Braun P, Sicinski P. A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells. *Cancer Cell.* 20(5): 620-634.

99. Wang BW, Lin CM, Wu GJ, Shyu KG. Tumor necrosis factor- α enhances hyperbaric oxygen-induced visfatin expression via JNK pathway in human coronary arterial endothelial cells. *J Biomed Sci.* 2011; 18:27.
100. Yang F, Liu YH, Yang XP, Xu J, Kapke A, Carretero OA. Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol.* 2002; 87(5): 547-555.
101. Fasanaro P, Greco S, Ivan M, Capogrossi MC, Martelli F. microRNA: emerging therapeutic targets in acute ischemic diseases. *Pharmacol Therapy.* 2010; 125(1): 92-104.

102. Wang C, Gao C, Zhuang JL, Ding C, Wang Y. A combined approach identifies three mRNAs that are down-regulated by microRNA-29b and promote invasion ability in the breast cancer cell line MCF-7. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012; 138(12):2127-36.
103. Lerner M, Haneklaus M, Harada M, Grander D. MiR-200c regulates Noxa expression and sensitivity to proteasomal inhibitors. *PLoS One.* 2012; 7(5): e36490.
104. Bae SK, Kim SR, Kim JG, Kim JY, Koo TH, Jang HO, Yun I, Yoo MA, Bae MK. Hypoxic induction of human visfatin gene is directly mediated by hypoxia-inducible factor-1. *FEBS Lett.* 2006; 580(17): 4105-4113.
105. Thompson RC, Deo M, Turner DL. Analysis of microRNA expression by in situ hybridization with RNA oligonucleotide probes. *Methods.* 2007; 43(2): 153-161.
106. Kulshreshtha R, Davuluri RV, Calin GA, Ivan M. A microRNA component of the hypoxic response. *Cell Death Differ.* 2008; 15(4): 667-671.
107. Imai S. Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt): a link between NAD biology, metabolism, and diseases. *Curr Pharm Des.* 2009; 15(1): 20-28.
108. Zhang T, Berrocal JG, Frizzell KM, Gamble MJ, DuMond ME, Krishnakumar R, Yang T, Sauve AA, Kraus WL. Enzymes in the NAD⁺ salvage pathway regulate SIRT1 activity at target gene promoters. *J Biol Chem.* 2009; 284(30): 20408-20417.
109. Ramsey KM, Yoshino J, Brace CS, Abrassart D, Kobayashi Y, Marcheva B, Hong HK, Chong JL, Buhr ED, Lee C, Takahashi JS, Imai S, Bass J. Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. *Science.* 2009; 324(5927): 651-654.
110. Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, Kaluzova M, Sassone-Corsi P. Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science.* 2009; 324(5927): 654-657.
111. Pillai JB, Isbatan A, Imai S, Gupta MP. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cardiac myocyte cell death during heart failure is mediated by NAD⁺ depletion and reduced Sir2alpha deacetylase activity. *J Biol Chem.* 2005; 280(52): 43121-43130.
112. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature.* 2005; 438(7068): 685-689.
113. Wang S, Olson EN. AngiomiRs - key regulators of angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2009; 19(3): 205-211.

11 Anhang

11.1 Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arteria</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
Aqua dest	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphat
Bis-Tris	bis(2-Hydroxyethyl) Aminotris (Hydroxymethyl) Methan
BM	<i>basal medium</i>
Bp	Basenpaare
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	<i>circa</i>
CDK4	<i>cyclin-dependent kinase 4</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)Dimethylammonium)-1-Propanesulfonat
cm	Centimeter
CMC	Kardiomyozyten
CO ₂	Kohlendioxid
ct	<i>cycle threshold</i>
CTRL	Kontrolle
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenolindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
dNTPs	Deoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBM-2	<i>endothelial basal medium</i>
EC	Endothelzellen

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-related kinases</i>
Ex/Em	<i>excision/emission</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FoxO-Proteine	<i>forkhead box type O-proteins</i>
G	<i>gauge</i>
GM	<i>growth medium</i>
g	Gramm
°	Grad
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCAECs	<i>human coronary artery endothelial cells</i>
HCl	Chlorwasserstoff
HDACs	Histondeacetylasen
HEK-Zellen	<i>human embryonic kidney-cells</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
Hg	Quecksilber
HIF	<i>hypoxia-inducible transcription factors</i>
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor (HIF) 1 α
HRP	<i>horseradish</i>
HUVECs	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
Hyp	Hypoxie
Ig	Immunglobulin
Inflam.	Inflammation
I/R	Ischämie-Reperfusion
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAD	<i>left anterior descending coronary artery</i>
LB-Medium	<i>lysogeny broth medium</i>
LDL	<i>low density lipoproteins</i>

l/min	Liter pro Minute
LNAs	<i>locked nucleic acids</i>
mM	Millimolar
MONICA	<i>MONItoring trends and determinants in Cardiovascular disease</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
miRNA	MicroRNA
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
N ₂	Stickstoff
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NA, NAM	Nicotinamid
Nampt	Nicotinamid Phosphoribosyltransferase
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
Nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NR	Nicotinamid Ribosid
n.s.	nicht signifikant
Nt	Nukleotide
O ₂	Sauerstoff
OH	Hydroxyl-Rest
2'-OMe/	2'-O-Methyl-Rest
2'-MOE	2'-O-Methoxyethyl-Rest

Anti-miRNAs	<i>2'-O-methyl oligoribonucleotides</i>
P-Wert	Signifikanzwert, engl. <i>p-value</i>
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
Per1	<i>period gene 1</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF-BB	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR-β	PDGF-Rezeptor β
PFA	Paraformaldehyd
pre-miRNA	<i>precursor miRNA</i>
pri-miRNA	Primäre miRNA
%	Prozent
Ran-GTP	<i>RAs-related nuclear protein-guanosine triphosphate</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RIVA	<i>Ramus interventricularis anterior</i> der <i>A. coronaria sinistra</i>
RO1-Plasmid	Kontroll-Plasmid
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Sec	Sekunde(n)
SIRT1	Sirtuin 1
SSC	<i>sodium chloride-sodium citrate buffer</i>
SOB-Medium	<i>super optimal broth medium</i>
TBS-T	<i>tris-buffered saline tween</i>
TierSchG	Tierschutzgesetz
Troponin I	<i>troponin-inhibiting protein</i>
Troponin T	Tropomyosin-bindendes Troponin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
U/min	Umdrehung pro Minute
UTR	<i>untranslated region</i>
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

VEGFR-1	VEGF-Rezeptor 1
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WST-1	<i>water soluble tetrazolium-1</i>
z.B.	zum Beispiel

12 Publikationen

12.1.1 Vorträge und Posterpräsentationen

12.1.2 Vorträge

The role of Nampt promoting angiogenesis after myocardial infarction

Cardiovascular Network Retreat in Schloss Rauischholzhausen in Ebsdorfergrund

15.-17.03.2012

The regulation of deacetylase SIRT1 in the ischemic myocardium

PROMISE Retreat in Barcelona, Spanien

30.11.-01.12.2011

Impact of the Nampt-SIRT1-axis for myocardial regeneration

PROMISE Retreat in Schloss Rauischholzhausen in Ebsdorfergrund

01.04.2011

Regulation of Sirt1 in the ischemic myocardium

PROMISE Retreat in Schloss Rauischholzhausen in Ebsdorfergrund

15.07.2010

The regulation of deacetylase SIRT1 in the ischemic myocardium

PROMISE Kick-off Meeting in Barcelona, Spanien

10.-12.12.2010

Diverse Vorträge zu eigenen „research results“ und Vorstellung fremder wissenschaftlicher Artikel im Journal Club im Rahmen des internal seminars des PROMISE-Graduiertenkollegs 02/2009-03/2012

12.1.3 Posterpräsentationen

Impact of the NAMPT-SIRT1 axis for angiogenesis after myocardial infarction

Jores K, Bielenberg W, Widmer-Teske R, Stieger P, Thölen C, Nef H, Hamm C, Sedding D

European Society of Cardiology Congress 2011, Paris; Frankreich

27.-31.08.2011

Regulation of Sirt1 in the ischemic myocardium

Jores K, Bielenberg W, Stieger P, Daniel JM, Tillmanns H, Sedding D

European Society of Cardiology Congress 2010, Stockholm; Schweden

28.08.- 01.09.2010

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

14 **Danksagung**

Herr Prof. Dr. H. Tillmanns sowie in Folge Prof. Dr. C. Hamm danke ich für die Unterstützung und Förderung wissenschaftlichen Arbeitens in der Abteilung Kardiologie und Angiologie der Universitätsklinik Gießen und Marburg, in deren Rahmen diese Arbeit entstehen konnte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. R. Gerstberger, der die Betreuung meiner Doktorarbeit übernommen hat und mir stets hilfsbereit zur Seite stand. Durch kritisches Hinterfragen und konstruktive Kritik verhalf er mir zu einer durchdachten Fragestellung sowie der fachgerechten Präsentation der Ergebnisse meiner Experimente und deren Diskussion.

Besonders möchte ich mich zudem bei Herrn Herrn Prof. Dr. D. Sedding für das spannende, aktuelle Thema und die Betreuung während meiner Doktorarbeit bedanken. Die regelmäßige wissenschaftliche Diskussion hat mich den Zugang zu wissenschaftlichen Fragestellungen und deren schrittweisen Beantwortung gelehrt. Bedanken möchte ich mich zudem für die kritische Durchsicht der Arbeit und die Möglichkeit, das Projekt national und international vorstellen und verteidigen zu dürfen.

Außerdem möchte ich mich ganz besonders bei Stefanie Wolfram und Dr. Rebecca Widmer-Teske bedanken, die mich über meine gesamte Forschungszeit begleitet haben, mich in viele Methoden des Labors eingeführt haben und mir regelmäßig mit gutem Rat zur Seite standen. Beide haben sich immer geduldig Probleme mit einzelnen Versuchen angehört, mich immer wieder aufgebaut und motiviert.

Meinen Mitdoktoranden Dr. Wiebke Bielenberg, Christiane Thölen, Dr. Jan-Marcus Daniel, Jochen Dutzmann, Kai Knöpp und Alexander Koch danke ich, dass sie mir meine Arbeitstage aufgelockert haben und bei Problemen immer ein offenes Ohr hatten. Insbesondere danke ich auch meinem Vorgänger Dr.

Philipp Stieger, der mich mit Geduld und Engagement in die Methode des Maus-Myokardinfarkt-Modells eingeführt hat.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

15 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus -Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6140-1



9 783835 196140 1